

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO**

**ESTUDO DA INERVAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDO
PULPAR HUMANO**

Daniela Sousa Coelho

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do
Desenvolvimento da Universidade
Federal de Santa Catarina como
parte dos requisitos para a obtenção
do grau de mestre em Biologia
Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mabel
Mariela Rodríguez Cordeiro.

Co-orientador: Paulo Fernando
Dias

Florianópolis, 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coelho, Daniela Sousa

Estudo da Inervação na Engenharia de Tecido Pulpar Humano / Daniela Sousa Coelho ; orientadora, Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro ; coorientadora, Paulo Fernando Dias. - Florianópolis, SC, 2015.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Polpa dental;. 3. Engenharia tecidual. 4. Neurogênese. 5. Inervação. I. Rodríguez Cordeiro, Mabel Mariela. II. Dias, Paulo Fernando. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

“Estudo da Inervação na Engenharia de Tecido Pulpar Humano”

Por

Daniela Sousa Coelho

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (005/BCD/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) Mabel Maria Rodríguez Cordeiro (MOR/CCB/UFSC)

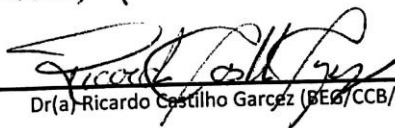
Banca examinadora:



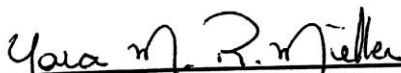
Dr(a) Michelle Tillman Biz (MOR/CCB/UFSC)



Dr(a) Ariadne Cristiane Cabral da Cruz (CIF/CCS/UFSC)



Dr(a) Ricardo Castilho Garcez (BEG/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Muller
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Florianópolis, 03 de março de 2015.

Dedicatória

Aos meus pais, Fernando e Vânia, que desde minha graduação vem dando suporte e apoio para que siga em frente com meus sonhos. A admiração que tenho por vocês é imensa.

À minha irmã Maria Fernanda, que me ensinou o dom da paciência.

Ao meu namorado Rafael, por ter me ajudado, nas mais diversas formas, obrigada por ser tão maravilhoso comigo.

Obrigada por compreenderem a ausência, a distância e as preocupações e por me ajudarem a estar aqui hoje. Amo muito vocês!

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Mabel Mariela Cordeiro, por ter me orientado e confiado em mim, para o desenvolvimento deste projeto. Obrigada pelos ensinamentos.

Ao meu co-orientador Dr. Paulo Dias, quem me orientada há sete anos, obrigada por ter aberto as portas do laboratório para mim e por tantos conselhos que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

À prof^a.Dr^a Eliane Goldfeder, que me ajudou e me ensinou técnicas fundamentais para a realização deste trabalho.

À prof^aDr^a Cristine Bressan, que com toda a paciência do mundo me ensinou a fazer imuno-histoquímica, além disso, me recebeu de braços abertos durante meu estágio docência em embriologia.

Aos professores do programa, que muito contribuíram para o meu crescimento acadêmico,

À prof. Dr^a. Cláudia Pinto Figueiredo, que também me deu dicas para realização de algumas técnicas.

Aos funcionários do laboratório de histologia do Centro de Ciências morfológicas, principalmente ao técnico Gilberto, pela paciência e ensinamentos dos cortes em parafina.

Aos funcionários do LAMEB, Demétrio e Emily, obrigada pela ajuda com as imagens.

À doutoranda em odontologia Luciane Geanine Pena dos Santos, que me acompanhou e ajudou em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada.

À doutoranda Viviane Polli, obrigada por todos os momentos de apoio, durante muitas fases de preocupação, pelos cafezinhos, pelos risos e pela amizade que se construiu.

À Dr^a Beatriz Veleirinho, de quem fui IC, e que me inspirou para continuar nesta jornada que é a vida na pesquisa, obrigada pelo grande crescimento profissional que tive ao seu lado, e pela amizade cultivada.

Agradeço também, ao meu anjo da guarda, que me protege, me guia e fortalece minhas energias.

Por fim, um agradecimento a todos os meus amigos e familiares que torceram e me suportaram ao longo destes 2 anos. Sou muito grata a todos que contribuíram para esta etapa de minha vida.

Por último, mas não menos importante. À coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, e também às agências financiadoras FAPESC e CNPq, pois sem estas verbas seria impossível a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Terapias regenerativas têm despertado o interesse no campo da Odontologia, acarretando uma mudança de paradigma ao empregar abordagens regenerativas para o tratamento das doenças ou agravos que afetam o dente. A polpa dental é caracterizada por apresentar uma população variada de células como odontoblastos, fibroblastos, células de defesa, microvasos e terminações nervosas sensoriais e simpáticas pós-ganglionares. As fibras nervosas são responsáveis pela homeostase do tecido, estando relacionadas com a manutenção do tônus vascular e condução de estímulos nociceptivos, dentre outros. A prerrogativa da engenharia tecidual é formar um tecido idêntico ou ao menos que apresente características morfológicas e funcionais muito semelhantes àquelas do original, assim, a engenharia de tecido pulpar deve formar um tecido inervado capaz de regular as estruturas neoformadas. Deste modo, o objetivo geral deste estudo foi estudar a possibilidade de desenvolver polpas dentais inervadas utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar. Para tanto, 3º molares hígidos tiveram a sua polpa removida e a cavidade pulpar preenchida com um arcabouço polimérico altamente poroso, onde foram semeado células-tronco de polpa dental (SHED). Os conjuntos fatia dental/arcabouços/SHED foram implantados bilateralmente no tecido subcutâneo do dorso de camundongos, decorridos 21 a 65 dias de implantação no tecido subcutâneo do dorso de camundongos, a imunolocalização dos elementos nervosos foi realizada por imuno-histoquímica para β tubulina III, NCAM e P75. Foi observada a formação de um tecido semelhante à polpa dental, com presença de terminações nervosas livres e organizadas em feixes nervosos. A organização fascicular foi proporcional com o aumento de tempo avaliado. Foi possível desenvolver polpa inervada utilizando o Modelo Fatia Dental/Arcabouço para engenharia de tecido pulpar, sendo que o processo de neurogênese ocorreu de maneira espontânea.

Palavras-chave: Polpa dental; Engenharia tecidual; Neurogênese; inervação.

ABSTRACT

Regenerative therapies have increased interest in the field of dentistry, causing a paradigm shift when using regenerative approaches for the treatment of diseases or injuries that affect the tooth. The dental pulp is characterized by presenting a diverse population of cells as odontoblasts, fibroblasts, immune cells, microvessels and sensory nerve endings and postganglionic sympathetic. The nerve fibers are responsible for the homeostasis of the tissue, being related to the maintenance of vascular tone and driving nociceptive stimuli, among others. The prerogative of tissue engineering is to form a fabric or at least equal to present morphological and functional characteristics very similar to those of the original, thus, the pulp tissue engineering must form a tissue innervated able to regulate the newly formed estrutras. Thus, the aim of this study was to evaluated the possibility of developing innervated dental pulps through the “The tooth slice/scaffold model for Dental Pulp Tissue Engineering”. Third molars had their pulp tissue removed and the pulp chamber filled with a highs porous polymer scaffold and seeding with Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). The tooth slice/scaffolds/SHED were implanted bilaterallyin the subcutaneous tissue of the dorsum. The detection of neural elements was performed by immunohistochemical technique using the anti β -tubulin III, anti-P75 and anti-NCAM. It was observed the formation of a similar material to the dental pulp in the presence of free nerve bundles and arranged in nerve endings. The proportional fascicular organization was evaluated with increasing time. We conclude that occurs a spontaneous neurogenesis process in dental / scaffolds seeded with (SHED).

Key words: Tooth; dental pulp; innervation; neurogenesis; regeneration; tissue engineering.

LISTA DE ABREVIATURAS

- α -MEM** – α -modified minimum essential
CT – Células-tronco
CTA – Células-tronco adultas
CTE – Células-tronco embrionárias
CTPD – Células-tronco de polpa dentária
DAB – Solução Cromógena
DMEN – *Dulbecco's modified eagle medium*
DMP – Proteína da matriz dentinária (*Dentin matrix protein*)
DPP – Proteína fosfodentinária (*Dentin phosphoprotein*)
DPSC – Células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos (*Dental pulp stem cells*)
DSP – Sialoproteína Dentinária (*Dentin Sialoprotein*)
FBS – Soro fetal bovino (*Fetal bovine serum*)
GDNF – Fator neurotrófico de células gliais (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*)
HE – Hemotoxilina de Harris e Eosina amarelada
NCAM – Molécula de adesão celular neural (*Neural cell adhesion molecule*)
NGF – Fator de crescimento neural (*Neural growth factor*)
P75 – Receptor do fator de crescimento neural
PB – Solução de penicilina e estreptomicina (*Penicillin-Streptomycin*)
PBS – Solução salina tamponada (*Phosphate-Buffered Saline*)
PLGA – Ácido láctico-co-ácido glicólico (*Poly-lactic-co-glycolic acid*)
PLLA – Ácido poli-L-láctico (*Poly-L-Lactic acid*)
PVPI – Polivinilpirrolidona iodo
SHED – Células-tronco de dentes decíduos (*Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte histológico corado com coloração tricômica de hematoxilina e eosina.....	26
Figura 2: Figura esquemática de um corte longitudinal do elemento dental.....	29
Figura 3: Trajetória do nervo do gânglio trigêmio até o interior da polpa	31
Figura 4: Terminações nervosas da polpa dental.....	33
Figura 5: Figura representativa das etapas da Odontogênese e da inervação sensorial da polpa.....	36
Figura 6: Moléculas neuroregulatórias sendo expressas durante as fases da odontogênese.	39
Figura 7: Esquema ilustrativo dos procedimentos nos grupos controle positivo, controle negativo e engenharia pulpar (teste).	53
Figura 8: Sequência cirúrgica para implantação do modelo de estudo.	59
Figura 9: Remoção das amostras da região dorsal do camundongo	60
Figura 10: Fotomicrografia de SHED em cultura	66
Figura 11: Fatias dentais recuperadas após 65 dias de implante no subcutâneo do dorso de camundongos não imunossuprimidos.	68
Figura 12: Fotomicrografias do corte corados com HE tempo zero.	70
Figura 13: Fotomicrografias dos cortes corados com HE.	70
Figura 14: Fotomicrografias dos fascículos nervosos encontrados na polpa dental do controle positivo.	71

Figura 15: Fotomicrografia da imunolocalização de anti- β tubulina III na polpa do grupo não implantado (dia zero)	74
Figura 16: Fotomicrografias da imunolocalização de anti- β tubulina III nas fatias dentais em função dos grupos e tempos experimentais.	75
Figura 17: Fotomicrografia da imunolocalização de anti- β Tubulina III.	76
Figura 18: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-NCAM. 78	
Figura 19: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-NCAM no grupo não implantado de polpa original.	78
Figura 20: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-NCAM em fascículos nervosos.	79
Figura 21: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-P75 em polpas não implantadas.	81
Figura 22: Fotomicrografias da imunolocalização da anti- p75.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados para a Imuno-histoquímica..... 64

Tabela 2: Intensidade de imunomarcção para os diferentes
anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica..... 82

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2 Revisão da literatura.....	22
2.1 Importância do dente para a ciência	22
2.2 Estrutura dental e seus elementos	23
2.3 Odontogênese	33
2.4 Sinalização celular na neurogênese do dente.....	36
2.5 Problemática Clínica	40
2.6 Uso das células tronco como terapia regenerativa do dente .	42
2.7 Células-tronco de origem dental	43
2.8 Polímeros utilizados na engenharia de tecidos dentais.....	44
3. Proposição	48
4. Objetivo Geral.....	50
4.1 Objetivos Específicos	50
5 Material e métodos.....	51
5.1 Considerações éticas	51
5.2 Considerações gerais	51
5.3 Cultura Celular.....	54
5.4 Obtenção dos dentes.....	54
5.5 Preparação das fatias dentárias	55
5.6 Preparação dos arcabouços	56
5.7 Inoculação das células-tronco nas fatias dentais com arcabouço	57

5.8 Implante do conjunto Fatia Dental/Arcabouço no dorso dos animais	57
5.8 Análises histológicas	61
5.9 Coloração histológica Hematoxilina de Harris e Eosina amarelada (HE).....	61
5.9 Imuno-histoquímica	62
5.10 Análise microscópica	64
6 Resultados	66
6.1 Análise morfológica das SHED em cultura.....	66
6.2 Estudo piloto.....	67
6.3 Aspecto macroscópico das fatias dentais recuperadas do implante.....	67
6.4 Análise Microscópica das Fatias Dentais	68
6.5 Análise microscópica da marcação neuronal.....	72
6.5.1 <i>Imunomarcação com Anti-β-Tubulina III</i>	72
6.5.2 <i>Imunomarcação com NCAM</i>	76
6.5.3 <i>Imunomarcação com P75</i>	79
6.5.4 <i>Escores de imunomarcação</i>	82
7 Discussão	83
Referências.....	91
Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	100

1. Introdução

O dente é um órgão extremamente especializado e fundamental para a sobrevivência dos animais. Esse órgão é constituído por uma estrutura rígida, com função de revestimento e sustentação, formada por esmalte, dentina e cimento. A parte mais interna do dente é formada por tecido conjuntivo frouxo especializado, chamado polpa dental. Essa região caracteriza-se por apresentar uma população variada de células como odontoblastos (células secretoras de dentina), fibroblastos, células-tronco mesenquimais, células endoteliais, células de defesa e terminações nervosas. As fibras nervosas são responsáveis pela homeostase do tecido, estando relacionadas com a manutenção do tônus vascular e condução de estímulos nociceptivos (Byers *et al.*, 2003; Luukko *et al.*, 2005; Kökten *et al.*, 2014; Luukko and Kettunen, 2014).

Nas últimas décadas, programas educacionais geraram maior acesso às informações sobre prevenção de doenças e, conseqüentemente, melhoria na saúde bucal da população. Entretanto, a cárie e o traumatismo dental, ainda, são as causas mais frequentes de inflamação e necrose pulpar levando à necessidade de tratamento endodôntico (Meira *et al.*, 2003; Alvarado *et al.*, 2007; Bjorndal *et al.*, 2014), na tentativa de manutenção do dente funcional na cavidade bucal. Quando ocorre a necrose da polpa dental, o processo de dentinogênese, processo de deposição de matriz e mineralização da dentina, são interrompidos e o dente para de se desenvolver.

O tratamento endodôntico em dentes com rizogênese incompleta é semelhante ao tratamento realizado em um dente maduro (i.e. pulpectomia, desinfecção e obturação). A pulpectomia, remoção total da polpa, seguida da desinfecção da cavidade pulpar e o seu preenchimento com material sintético (obturação do canal

radicular e restauração da câmara pulpar) resulta em um dente sem vitalidade e desidratado, além de interromper a deposição de dentina sobre as paredes da cavidade pulpar, deixando para trás um dente com raiz pouco desenvolvida, tanto no sentido do comprimento quanto da espessura das paredes, resultando em uma estrutura radicular frágil e susceptível à fratura, com prognóstico ruim a médio/longo prazo, podendo levar à perda do elemento dental (Berggreen *et al.*, 2001; Banchs and Trope, 2004 ; Nor, 2006; Demarco *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, avanços nas áreas de terapia celular e engenharia tecidual têm possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento, com maior eficácia, das afecções dentais, melhorando assim o prognóstico de sobrevida do órgão e melhorando a qualidade de vida do paciente (Nor, 2006; Nagy *et al.*, 2014). Dessa forma, a regeneração de estruturas dentais tem sido foco de muito interesse das pesquisas no campo da odontologia, que visam empregar abordagens regenerativas para o tratamento das doenças ou agravos que afetam o órgão dental. Vários grupos de pesquisa, entre eles o nosso, vêm procurando a possibilidade de abordagens terapêuticas mais biológicas e de medicina regenerativa na tentativa de substituir tecidos dentais perdidos por tecidos neoformados, semelhantes ao original. Nesta abordagem, emprega-se a tríade da engenharia tecidual, utilizando enxertos de células-tronco, fatores de crescimento e de diferenciação, e arcabouços de origem sintética ou natural (Nor, 2006; Cordeiro *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2011; Sakai *et al.*, 2011; Arany *et al.*, 2014; Eap *et al.*, 2014; Kökten *et al.*, 2014).

Utilizando essa abordagem, o nosso grupo tem conseguido desenvolver um tecido conjuntivo semelhante à polpa dental, associando células-tronco, arcabouços poliméricos e fatores de crescimento, utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar(Cordeiro *et al.*, 2008), sendo possível

observar a formação de um tecido ricamente vascularizado, com densidade celular semelhante à do tecido pulpar. Além da presença de uma camada de células delineando a dentina, mimetizando dessa forma a camada original de odontoblastos. Estudos anteriores demonstraram, por meio de análises imuno-histoquímicas, que essas células expressam as mesmas proteínas que os odontoblastos, como por exemplo, a sialoproteína dentinária (DSP, da sigla em inglês *DentinSialoprotein*) e a proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1, da sigla em inglês *DentinMatrix Protein1*), sugerindo que ocorre a diferenciação das células-tronco em células tipo odontoblastos, que poderiam ser capazes de secretar e mineralizar dentina tubular (Cordeiro *et al.*, 2008 ; Sakai *et al.*, 2011).

Os odontoblastos são conhecidos como células mecanosensoriais, devido à proximidade de seus prolongamentos com terminações nervosas nos túbulos dentinários. Dessa forma, as fibras nervosas parecem controlar a deposição das novas camadas de dentina, embora o exato mecanismo desse processo ainda não tenha sido elucidado (Allard *et al.*, 2006; Carda and Peydró, 2006; Byers and Westenbroek, 2011; Pagella *et al.*, 2014). Além da importância da inervação para a regulação de estímulos nociceptivos transmitidos ao sistema nervoso central, as fibras nervosas também desempenham um papel ativo em conjunto com o sistema imunológico na modulação das respostas e combate a estímulos nocivos (Hahn and Liewehr, 2007; Chiu *et al.*, 2012; Couve *et al.*, 2013). Entretanto, poucas são as pesquisas que abordam a inervação do tecido pulpar, demonstrando a necessidade de novos estudos que possam futuramente auxiliar a engenharia de um tecido pulpar inervado, no que se refere à sua morfologia e função, de modo a regenerar a polpa.

Nas pesquisas do nosso grupo, houve deposição centrípeta de nova dentina nas polpas neoformadas, depositada pelos odontoblastos recém-diferenciados, porém esse processo ocorreu a

uma velocidade semelhante à deposição de dentina primária, ou seja, mais rapidamente do que nos grupos controle de polpa original, indicando uma maior atividade secretória das células recém-diferenciadas ou um menor controle tecidual sobre a atividade celular (Sakai *et al.*, 2010). No entanto, a regulação da deposição de novas camadas de dentina nos tecidos neoformados é de fundamental importância para que não ocorra a obliteração do canal radicular (Nor, 2006). Assim como, é necessária o reestabelecimento da inervação nociceptiva para proteção do tecido frente à injúrias que possam acometer o elemento dental.

Com base nisso, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de inervação na engenharia de polpa dental utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar.

2 Revisão da literatura

2.1 Importância do dente para a ciência

O dente é um órgão indispensável para a nutrição e fisiologia, estando envolvido nos processos de mastigação e digestão, embora em outros vertebrados também sirva como ferramenta de caça (Nakashima, 2005; Jernvall and Thesleff, 2012). Devido ao seu grau de complexidade e diversidade entre as espécies, o dente se tornou objeto de estudo na paleontologia, antropologia, biologia e áreas a fins (Jernvall and Thesleff, 2012). Muito do nosso entendimento sobre hábitos alimentares e evolução das diferentes espécies são baseados em registros fósseis de elementos dentais (Huyseune *et al.*, 2009). Por possuir uma alta resistência os vestígios dentais podem ser usados para identificação de corpos e resolução de crimes pelos peritos forenses (Verma *et al.*, 2014).

Mais recentemente, foi descoberta uma nova importância para os dentes: a de fonte de células-tronco. A descoberta de células-tronco na polpa dos dentes permanentes e decíduos (dentes de leite) possibilitou o uso dessas células na engenharia tecidual. As células-tronco da polpa dentária (CTPD) são capazes de se auto-renovar e se diferenciar em múltiplas linhagens. No caso das células-tronco de dentes decíduos (SHED, da sigla em inglês: *StemcellsfromHumanExfoliatedDeciduousteeth*) a facilidade com que estas células podem ser isoladas, de modo não invasivo e sem riscos para o paciente vem de encontro com uma das grandes discussões em torno do uso de células-tronco em terapias celulares. Uma vez que existe uma grande discussão ética, científica e religiosa sobre o uso de células-tronco embrionárias obtidas a partir do blastocisto. Sendo as células-troncos provenientes da polpa dental uma alternativa a ser estudada(Gronthos *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003).

Estes estudos revelamque o dente é um órgão de fundamental importância em diversas áreas da ciência, e para o nosso trabalho a compreensão das estruturas dentais e seus constituintes é necessária para a discussão dos resultados obtidos.

2.2 Estrutura dental e seus elementos

Cronológica e morfológicamente, existem duas classificações para as dentições: dentição decídua e permanente. Entre essas dentições, há uma fase de transição conhecida como dentição mista (Messer and Till, 2013). A dentição decídua, ou primária, na qual os elementos são popularmente conhecidos como dentes de leite, consistem em 20 dentes e desenvolve-se durante o período pré-natal. A erupção dos dentes decíduos normalmente é iniciada aos seis meses de vida e completamente formada até os 6 anos de idade. Com

a erupção do primeiro molar inferior permanente, inicia-se o período de dentição mista, marcado pela troca dos dentes decíduos pela dentição permanente. Essa fase se prolonga até os 12 anos. A partir desta idade, ou até que o último dente decíduo tenha sido substituído, inicia-se a dentição permanente. A dentição permanente é constituída por 32 dentes, sendo que 20 que substituem a dentição decídua e são definidos como sucessores, e os outros 12 dentes, que são adicionados na medida em que os maxilares se desenvolvem. Tanto dentes decíduos, quanto os permanentes, seguem os mesmo estágios de desenvolvimento, e apresentam os mesmos elementos constituintes, diferindo apenas forma e no tamanho (Avery *et al.*, 2005; Bath-Balogh and Fehrenbach, 2012).

Anatomicamente, o dente é dividido em duas partes: a coroa e a raiz (Figura 2A)(Katchburian, 2004; Avery *et al.*, 2005; Bath-Balogh and Fehrenbach, 2012). A Coroa é a parte mais resistente do dente, suportando os traumas causados pelo ato de morder e mastigar. É recoberta por um tecido extremamente resistente e cristalino denominado esmalte (Katchburian, 2004). O esmalte, por sua vez, é um tecido altamente mineralizado e acelular, sendo produzido como resultado da atividade de secreção e reabsorção de células epiteliais, denominadas de ameloblastos, sendo a estrutura mais resistente do corpo, uma vez que os cristais de hidroxiapatita, que o constituem, são extremamente grandes e bem organizados, levando a formação de uma estrutura rígida, forte e resistente (Avery *et al.*, 2005).

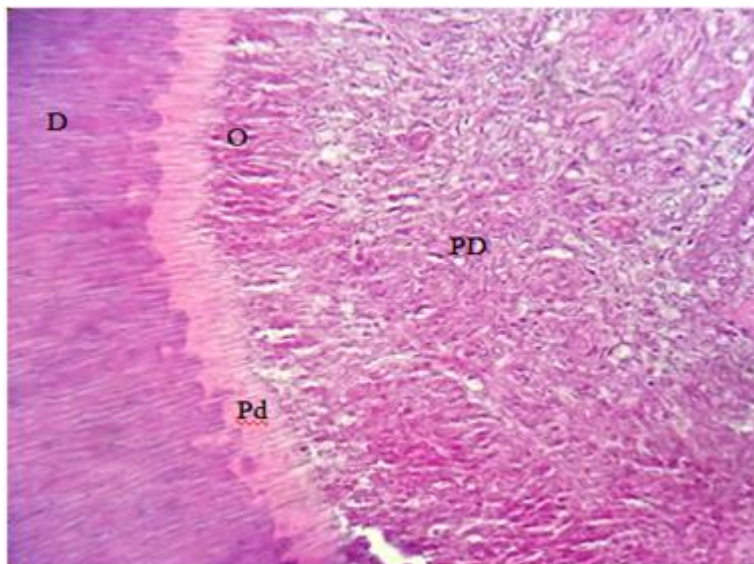
Já a raiz possui função de suporte e sustentação. Diferente da coroa, que necessita de um recobrimento resistente, as raízes dentais são recobertas por cemento, um tecido conjuntivo mineralizado, cuja principal função é alojar fibras colágenas promovendo pontos de ancoragens com o ligamento periodontal (Katchburian, 2004).

Por sua vez, o ligamento periodontal é caracterizado por uma camada de tecido conjuntivo, ricamente celularizado, responsável

pela secreção de colágeno, necessária para a formação de fibras colágenas, sendo essas responsáveis pela fixação do dente ao osso alveolar, fator determinante para suportar a pressão exercida durante o processo da mastigação(Coura *et al.*, 2008; Polli, 2011).

Internamente as camadas superficiais, descritas acima, encontra-se a dentina, tecido mais resistente que o cemento devido à alta concentração de minerais, e mais flexível que o esmalte, por conter o fluido dentinário e fibras colágenas, que operam como amortecedores frente à força exercida durante a mastigação (Cate, 2008; Bath-Balogh and Fehrenbach, 2012). A dentina é formada pelos produtos de secreção dos odontoblastos, sendo uma estrutura relevante tanto para a proteção de regiões mais internas do dente, quanto suporte para o esmalte sobrejacente. Ao contrário do esmalte que é uma estrutura acelular, a dentina é vital e permeável, contendo os prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos e terminações nervosas, que se localizam nos túbulos dentinários (Avery *et al.*, 2005). Estas estruturas, resistentes recobrem a porção mais interna do dente conhecida como câmara pulpar, região que está ocupada pela polpa dental (Figura 1)(Cate, 2008).

Figura 1: Corte histológico corado com coloração tricômica de hematoxilina e eosina. Evidenciando as camadas de dentina (D), a pré-dentina (Pd), odontoblastos (O), e a polpa dental (PD).



Fonte: do Autor.

A polpa dental é o tecido responsável pela vitalidade do dente. Nela, são encontradas populações variadas de células, que mantêm órgão em funcionamento, como odontoblastos, fibroblastos, células-tronco mesenquimais, células endoteliais, células de defesa e terminações nervosas (Kettunen *et al.*, 2005; Luukko and Kettunen, 2014). Podendo ser dividida em dois compartimentos: a zona odontogênica, que inclui os odontoblastos, que são as células responsáveis por sintetizar a pré-dentina e a dentina. Além da polpa propriamente dita, que é constituída principalmente de fibroblastos, matriz extracelular, vasos e nervos (Figura 2B) (Avery *et al.*, 2005).

O tipo celular mais predominante na polpa dentária é o fibroblasto, essa célula é responsável pela síntese de matriz extracelular, secretando diferentes tipos de colágeno, proteoglicanose

glicosaminoglicanos. Além disso, os fibroblastos podem, simultaneamente ao processo de síntese, degradar a matriz extracelular, no processo de remodelagem sendo esse o mecanismo natural de lesão/cicatrização da polpa(Averyet *al.*, 2005; Nanci, 2012). Células envolvidas nas respostas inflamatória e imune, tais como linfócitos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas e plasmócitos, também podem ser encontradas na polpa durante períodos de inflamação, sendo fundamentais contra uma infecção, pois liberam substâncias, quimiocinas e citocinas e outros mediadores celulares, para uma resposta antiinflamatória mais rápida e eficaz (Nanci,2012).

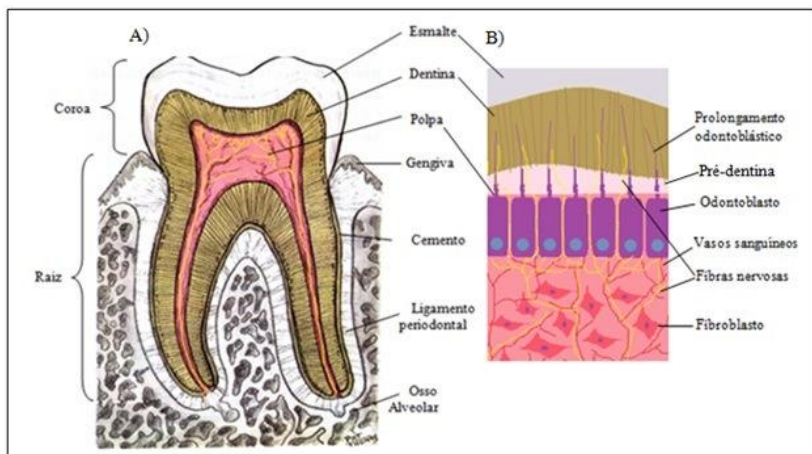
Entretanto, a célula que caracteriza a polpa dental é o odontoblasto. Os odontoblastos são células pós-mitóticas, derivadas da crista neural, altamente especializadas (Couve *et al.*, 2013). Anatomicamente, essas células se organizam em uma única camada na periferia da polpa. Uma particularidade dessas células é que, enquanto o corpo da célula se localiza na polpa dental, o seu prolongamento citoplasmático está posicionado na dentina, sendo que qualquer alteração do complexo dentina-pulpa são sentidos por estas células(Magloire *et al.*, 2009). Os odontoblastos têm como função, e sua principal característica, a síntese e secreção de matriz dentinária, composta por colágeno e matriz extracelular. A matriz dentinária não mineralizada é chamada de pré-dentina. Posteriormente, a secreção de proteínas não colágenas como proteína fosfodentinária (DPP, do inglês *DentinPhosphoProtein*), sialoproteínadentinárias (DSP), proteína de matriz dentinária (DMP), decorina e biglicana, acabam por mineralizar gradualmente a matriz dentinária (Averyet *al.*, 2005).

Os odontoblastos também são considerados células mecanosensoriais, cujo papel pode estar envolvido no estímulo das células da polpa, responsáveis por uma resposta rápida frente à injúria. A importância dos odontoblastos como pivô da resposta

inflamatória é devido a sua localização, estando presente tanto nos túbulos dentinários, através dos seus prolongamentos, quanto na polpa, onde está o corpo celular. Os odontoblastos podem ser sensibilizados pelas terminações nervosas frente mudanças na superfície dentinária e rapidamente recrutar células de defesa, alterando a microcirculação da polpa para defesa do tecido e sobrevivência do órgão(Avery *et al.*, 2005; Carda and Peydró, 2006; Magloire *et al.*, 2009; Couve *et al.*, 2014).

Além da parte morfológica e estrutural descrita acima, o dente recebe irrigação sanguínea para a manutenção e nutrição do elemento dental. Os vasos sanguíneos penetram na polpa pelo forame apical, região que serve de canal de comunicação entre a polpa e estruturas externas ao dente. Os capilares e vênulas se ramificam ao longo da polpa, até alcançar a camada odontoblástica. Sendo a principal função da microcirculação suprir as células de oxigênio e nutrientes, assim como promover uma via de excreção dos restos metabólicos teciduais. Essas trocas ocorrem por difusão, nos capilares, e produtos teciduais são removidos da polpa por meio das vênulas (Yu and Abbott, 2007).

Figura 2: Figura esquemática de um corte longitudinal do elemento dental. A) Evidenciando as duas partes anatômicas do dente, coroa e raiz; estruturas de sustentação, como o ligamento periodontal, cemento, osso alveolar; estruturas mineralizadas de proteção, a dentina e o esmalte; e a polpa dental. B) Detalhes para a vascularização em vermelho e a inervação em amarelo, que chegam até os odontoblastos, participando do seu metabolismo na síntese de pré-dentina e mineralização da dentina, através de seus prolongamentos pelos túbulos dentinários.



Fonte: Adaptado de (Bath-Balogh andFehrenbach, 2012).

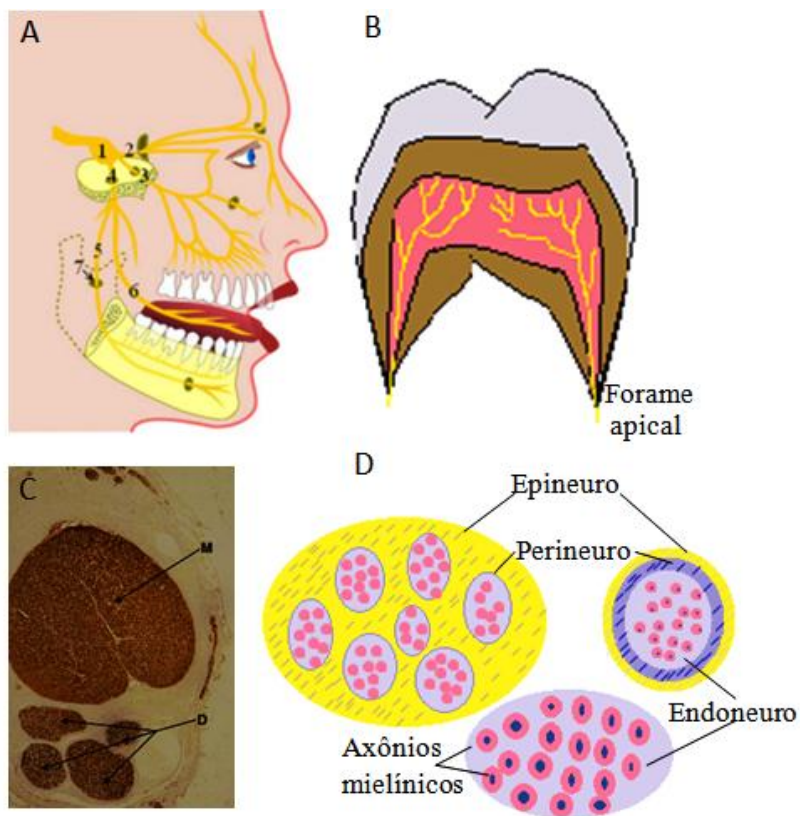
Seguindo o mesmo trajeto da vascularização temos a inervação pulpar, entrando na polpa pelo forame apical (Figura 3 B) e se ramificando na face coronária (Figura 3 C), próxima aos odontoblastos(Byers *et al.*, 2003; Kettunen *et al.*, 2005; Luukko *et al.*, 2005). A inervação se origina de dois locais distintos, as fibras nervosas sensoriais, são derivadas do gânglio trigêmeo, e as fibras nervosas simpáticas, são derivadas do gânglio cervical (Byers *et al.*, 2003). A inervação dos dentes mandibulares é proveniente do nervo alveolar inferior (estrutura detalhada no item 5 da Figura 3 A), enquanto que as dos dentes maxilares, são originadas pelos nervos maxilares (item 4 da Figura 3 A). Em conjunto estas fibras formam uma complexa rede, responsável por manter a homeostase do dente, estando envolvidas no processo da mastigação, na regulação do fluxo

sanguíneo, nas reações inflamatórias e no reparo tecidual (Kettunen *et al.*, 2005; Luukko *et al.*, 2005; Jernvall and Thesleff, 2012).

Uma análise ultraestrutural dos feixes da polpa dental revelou um conjunto de terminações nervosas ao longo da estrutura do dente. Na região subjacente à camada de odontoblastos é observada uma grande ramificação, que leva à formação do plexo de Raschkow (Byers *et al.*, 2003; Fried *et al.*, 2007). Este plexo é formado por fibras mielinizadas e/ou amielinizadas (Fried *et al.*, 2000; Byers *et al.*, 2003). Exibindo uma descontinuidade progressiva do revestimento mielínico das fibras nervosas, na porção coronal do dente (Byers *et al.*, 2003; Yu and Abbott, 2007).

As terminações nervosas livres podem adentrar a camada odontoblástica, penetrando na pré-dentina e dentina interna, através dos túbulos dentinários próximos aos processos odontoblásticos, formando uma rede de fibras livres, sendo esses receptores específicos para a dor (Byers and Taylor, 1993; Caviedes-Bucheli *et al.*, 2007; Yu and Abbott, 2007; Luukko and Kettunen, 2014).

Figura 3: Trajetória do nervo do gânglio trigêmio até o interior da polpa. A) Nervo trigeminal e seus ramos terminais periféricos, onde 1. gângliotrigêmio; 2. nervo oftálmico; 3. nervo maxilar; 4. nervo mandibular; 5. nervo alveolar inferior; 6. nervo lingual; 7. forame mandibular; 8. nervo alveolar inferior no canal mandibular; 9. canal mandibular. B) Esquema ilustrativo do elemento dental com detalhe para o forame apical, região de chegada dos feixes nervosos para a polpa. C) Corte transversal de um nervo alveolar inferior, destacando seus fascículos (M – mental e D- dental). D) esquema ilustrativo do nervo alveolar, constituído por fascículos em azul e suas camadas fibrosas de revestimento.



Fonte: A) Adaptado de (Martens *et al.*, 2013); B) do autor; C) Adaptado de (Kçiku *et al.*, 2011); D) do autor.

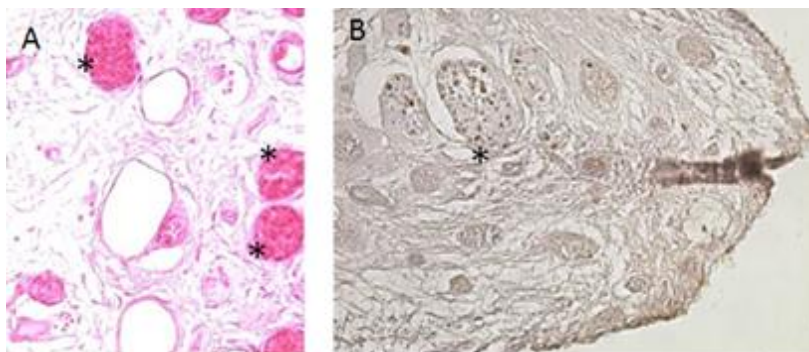
Para o entendimento do nosso trabalho se faz necessário o conhecimento prévio da anatomia dos nervos, suas estruturas e suas devidas nomenclaturas. De forma simplificada, pode-se entender que o nervo (Figura 3 A) está envolvido por um tubo de tecido conjuntivo denso chamado de epineuro (Figura 3 D). Este, por sua vez, possui vários fascículos nervosos (Figura 3 C), sendo esses envolvidos por outra camada de tecido conjuntivo frouxo, chamada de perineuro (Figura 3 D). Por fim, internamente a estas estruturas, fascículos, encontramos o endoneuro, camada de fibras reticulares que delimitam as fibras nervosas (Figura 3 D).

Resumindo, os fascículos nervosos são aglomerados de fibras nervosas. Por definição, uma fibra nervosa é formada por um axônio e seu envoltório, a bainha de mielina. Assim, uma fibra nervosa pode ser formada por axônios mielínicos e amielínicos (Cowan *et al.*, 1997; Martini *et al.*, 2009). Os fascículos nervosos acessam à polpa somente nos estágios finais do desenvolvimento dental, quando já ocorreu a síntese de esmalte e dentina (Shrestha *et al.*, 2014). As etapas finais da inervação do dente são dependentes da ramificação e reorganização dos axônios já existentes, que penetram pela polpa por meio de feixes.

Trabalhos prévios do nosso grupo compararam a interação das terminações nervosas da polpa com processos de reabsorção radicular em dentes decíduos, bem como, em processos patológicos inflamatórios em polpas de dente permanente (Chagas *et al.*, 2012). Para isso, foram feitos cortes transversais na raiz submetidos a processamento histológico com técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE) e imunomarcagem com β -Tubulina III, os resultados obtidos das estruturas nervosas encontradas na polpa são mostrados na Figura 4. Neste trabalho, foi constatado que as terminações nervosas estão em maior número, em dentes decíduos em etapa de reabsorção óssea, e em polpas inflamadas quando comparadas com

polpas de dentes hígidos. Reforçando a interação da inervação nos processos inflamatórios da polpa.

Figura 4: Terminações nervosas da polpa dental.(A) Estruturas semelhantes a feixes nervosos corada com HE. (B) Imuno-marcação com β -Tubulina III das terminações nervosas encontradas na polpa.



Fonte: Adaptado de (Chagas *et al.*, 2012)

O posicionamento e a trajetória dos axônios no interior da polpa dental são direcionados por vários fatores de crescimento, secretados ao longo de todo o processo de odontogênese (Thesleff, 2003; Kettunen *et al.*, 2005; Luukko *et al.*, 2005; Luukko and Kettunen, 2014).

2.3 Odontogênese

O desenvolvimento do dente tem início com a interação do epitélio oral de revestimento e o mesoderma, subjacente, derivado das células da crista neural (Loes *et al.*, 2001; Thesleff, 2003; Kettunen *et al.*, 2005; Luukko *et al.*, 2005; Luukko and Kettunen, 2014). O primeiro sinal morfológico de diferenciação observado em humanos ocorre entre a quinta e sexta semana de desenvolvimento embrionário. Esse sinal é o espessamento da camada basal do

epitélio oral na região da mandíbula e maxila, (Figura 5 A) que originará a lâmina dental no embrião (Thesleff, 2003). O processo continua a se desenvolver seguido por movimentos morfogenéticos que darão origem às fases subsequentes que conhecidas como: botão, capuz e campânula, as quais serão abordadas no decorrer do texto (Figura 5) (Thesleff, 2003; Luukkoet *al.*, 2005).

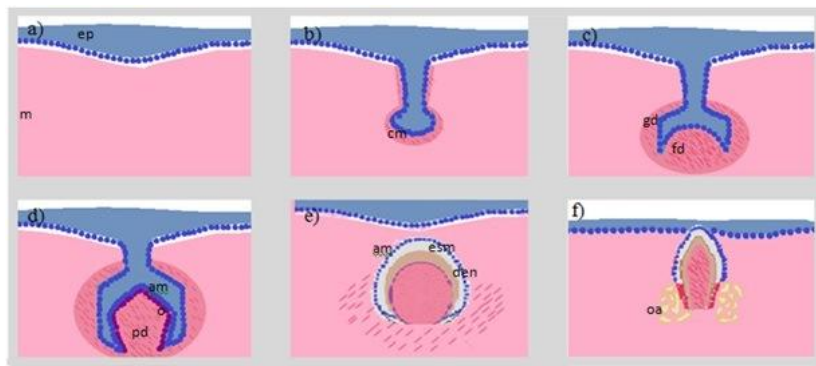
A fase de broto (botão) (figura 5 B) é marcada por uma grande proliferação da lâmina dental (células ectodermas) que penetram em direção ao interior do mesênquima adjacente, formando uma estrutura em forma de botão. Cada broto juntamente com seu ectomesênquima adjacente, originará o germe dental, sendo esse conhecido como o primórdio dos dentes (Thesleff and Sharpe, 1997; Luukkoet *al.*, 2005; Bath-Balogh and Fehrenbach, 2012).

O terceiro estágio da odontogênese é conhecido como estágio de capuz, (Figura 5 C) nele o processo de proliferação das células ectodermas continua, porém, de forma irregular em diferentes partes do broto, levando a formação de uma estrutura semelhante a um capuz. Além disso, o ectomesênquima remanescente que envolve a superfície externa do capuz condensa-se para formar uma estrutura semelhante a uma cápsula, chamada de papila dental (Thesleff, 2003; Luukkoet *al.*, 2005).

Na fase posterior do desenvolvimento, denominada de campânula, (Figura 5 D) ocorre o surgimento da morfologia definitiva da coroa. Nessa fase, as células do germe dental começam a se diferenciar, dando forma às estruturas dentárias. Primeiro ocorre à formação da morfologia da coroa, com a diferenciação do epitélio interno do germe dental em ameloblastos. Ao mesmo tempo na porção superior do tecido mesenquimal da papila dental, ocorre à diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos, responsáveis pela síntese de dentina (Thesleff, 2003; Luukkoet *al.*, 2005).

Os estágios finais da odontogênese incluem as etapas de aposição, (Figura 5 E) que é marcado por uma intensa atividade secretora das células especializadas para formação esmalte, dentina e cimento em camadas sucessivas. Em seguida, a etapa de maturação, (Figura 5 F) quando as matrizes de tecidos duros do dente completam sua mineralização. Quando a coroa do dente está completamente formada e o dente começa a irromper em direção à cavidade bucal, o processo de desenvolvimento dos tecidos de suporte do dente vão se formando simultaneamente a deposição de dentina na câmara pulpar, que vai se estreitando até formar um canal por onde a polpa se comunica com vasos e nervos. Subsequentemente, a raiz se conecta ao osso alveolar (Kettunen *et al.*, 2005; Luukko *et al.*, 2005; Bath-Balogh and Fehrenbach, 2012). Durante essas fases, existe a presença constante de sinais indutivos de moléculas reguladoras que participam de toda a odontogênese (Thesleff and Sharpe, 1997; Loes *et al.*, 2001; Kettunen *et al.*, 2005; Maurin *et al.*, 2005; Bei, 2009; Bath-Balogh and Fehrenbach, 2012; Couve *et al.*, 2013; Luukko and Kettunen, 2014; Shrestha *et al.*, 2014).

Figura 5: Figura representativa das etapas da Odontogênese e da inervação sensorial da pulpa. a; b; c; d; e; f são as fases da odontogênese: Formação da lâmina denta estágio de broto, capuz, campânula, aposição e maturação, respectivamente. (ep) epitélio; (m) mesenquima; (cm) células mesenquimais; (gm) germe dental; (fd) folículo dental; (pd) papila dental; (am) ameloblasto; (o) odontoblastos; (esm) esmalte; (den) dentina; (ao) osso alveolar.



Fonte: do Autor.

2.4 Sinalização celular na neurogênese do dente

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso as fibras nervosas em crescimento são guiadas para os tecidos alvos através da combinação de moléculas de sinalização morfogenéticas, que podem interagir pelo contato célula-célula ou célula-matriz extracelular. Algumas moléculas de sinalização, já são bem evidenciadas, quanto ao seu papel de “guia” na trajetória axonal para o germe dental. Uma das principais características destas moléculas guias, é que sua expressão pode ser regulada espaço temporalmente, ao longo do desenvolvimento do dente, atuando na atração ou repulsão de fibras nervosas conforme a etapa de morfogênese do órgão, e do grau de diferenciação das células envolvidas (Luukko *et al.*, 2005).

Uma hipótese que vem sendo testada é que a expressão de moléculas sinalizadoras e seus fatores de transcrição orquestram não somente a odontogênese, como também podem servir de estímulos para a secreção de moléculas neuroregulatória, que irão guiar a trajetória do axônio trigeminal até o interior da polpa (Mitsiadis and Luukko, 1995; Luukko, 1998; Bei, 2009).

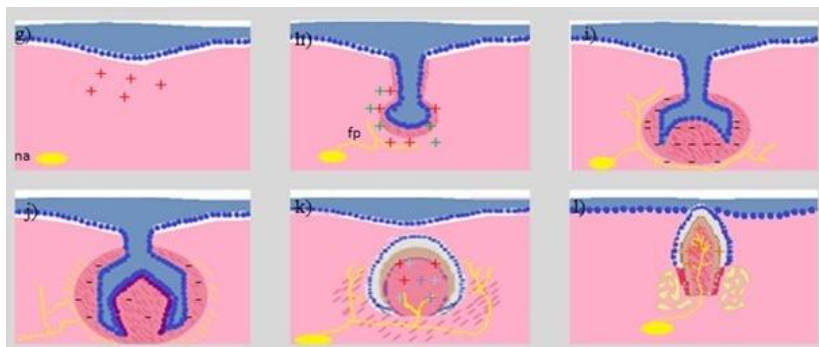
A inervação sensorial alcança a polpa através de uma fibra nervosa pioneira, que atinge a região de espessamento no epitélio oral, através do nervo alveolar e se posiciona no germe dental, ainda na fase inicial de broto (Figura 6 G) (Luukkoet *al.*, 2005; Shresthaet *al.*, 2014). Subsequente a isso, as fibras nervosas crescem e se ramificam na periferia do germe dental, gerando a inervação do mesênquima da papila dental (figura6 H) (Shresthaet *al.*, 2014). Porém, os nervos sensoriais penetram na cavidade pulpar apenas após a fase de formação do esmalte (LuukkoeKettunen, 2014). A posição e a trajetória ocupada pelos axônios correspondem a diferentes períodos de secreção de fatores de crescimento quimioatrativos, pela polpa (Bei, 2009). Os fatores de crescimento são moléculas regulatórias, dentre elas algumas estão envolvidas no processo de neurogênese, como a molécula de adesão celular neural (NCAM, do inglês *Neural CellAdhesionMolecule*), semaforinas, proteínas de membrana, fatores de crescimento neurotróficos, como o, fator de crescimento neural (NGF, do inglês *NerveGrowthFactor*) e o fator neurotrófico de células gliais (GDNF, do inglês *Glialcellline-DerivedNeurotrophicFactor*), que atuam mediando o contato e a atração de axônios em crescimento (Kettunenet *al.*, 2005).

O NGF, especificamente, é expresso pelo mesênquima dental, ainda na fase de botão, sendo responsável pela atração da fibra até o germe dental (Figura 6 G-H)(Luukkoet *al.*, 2005). Em contrapartida, foi demonstrado por Shrestha e colaboradores (2014) que a Semaforina 3A, uma proteína da família das semaforinasrelacionadas

com a trajetória axonal, tem o papel relevante em repelir fibras nervosas em etapas iniciais da odontogênese, sendo secretadas pelas células ectomesenquimais apenas no estágio de capuz e no início da fase de campânula. Limitando assim a difusão axonal para o interior do tecido pulpar, uma vez que somente após a diminuição da expressão deste fator as fibras nervosas penetram a polpa (Figura 6 I) (Friedet *et al.*, 2000; Shrestha *et al.*, 2014; Wada *et al.*, 2014). Também foi demonstrado que uma inibição deste fator, em animais nocaute, resultou num complexo dentino-pulpar com um padrão de inervação anormal, pois os axônios penetraram prematuramente na polpa (Thesleff, 2003). Por outro lado, a semaforina7 A, outra classe de proteína da família das semaforinas, é expressa em odontoblastos humanos e sua principal função está relacionada com o estabelecimento da inervação no complexo dentino-pulpar nos estágios finais do desenvolvimento (Figura 6 L-J). Por sua capacidade modulatória sobre o processo de inervação, sugere-se que esta proteína pode ser uma candidata alvo para a engenharia de tecidos (Maurinet *et al.*, 2005; Couve *et al.*, 2013).

Estes resultados indicam que algumas moléculas sinalizadoras que mediam as interações entre os tecidos odontogênicos também regulam a inervação dentária, por meio do controle da expressão de proteínas neuroregulatórias secretadas pela polpa (Luukko and Kettunen, 2014).

Figura 6: Moléculas neuroregulatórias sendo expressas durante as fases da odontogênese. g; h; i; j; k; l representa a trajetória axonal desde a chegada da fibra primordial (fp) ao nervo alveolar (na) até sua completa ramificação na camada odontoblástica. As cruzes representam moléculas sinalizadoras que atraem a inervação, estimulam seu crescimento e ramificação das fibras nervosas, (+ são NGF; + GDNF; + NCAM; + netrina; + Sema 7a). (- representa a proteína Sema 3A, que atua repelindo as fibras nervosas em períodos chave do desenvolvimento).



Fonte: do autor

Devida a essas evidências, que afirmam que o órgão dental conta com uma gama complexa de eventos e interações celulares controladas espaço-temporalmente, de acordo com as etapas do seu desenvolvimento do dente (Kettunen, 2005), a Odontologia juntamente com as áreas de neurobiologia e engenharia de tecidos, busca entender esses processos e levar para a clínica novos métodos que possam ser utilizados na manutenção da longevidade do dente, e como consequência em uma melhor qualidade de vida do paciente.

2.5 Problemática Clínica

Como já descrito anteriormente a polpa dental é um tecido mesenquimal altamente especializado, delimitado por um tecido rígido e mineralizado. Durante um processo inflamatório na polpa, a fase de edema fica comprometida devido ao confinamento deste tecido entre paredes rígidas, o que eleva o potencial de dor (Smith, 2002; 2003).

Atualmente são propostos três mecanismos de hipersensibilidade dental (Byers and Narhi, 1999; Carda and Peydró, 2006; Chung *et al.*, 2013). O primeiro deles, e o mais aceito pelos especialistas, é a teoria hidrodinâmica; quando, através da dissolução da matriz dentinária, altera-se o movimento do fluido nos túbulos dentinários, mudança que será detectado pelas fibras nervosas na camada de dentina. Uma segunda teoria é a neural; essa afirma que qualquer alteração do complexo dentino-pulpar será percebida pelas terminações sensoriais. Por fim, temos a teoria da transdução, onde os odontoblastos são considerados células mecanosensoriais, capazes de transmitir estímulos para as fibras nervosas nociceptivas (Chung *et al.*, 2013; Couve *et al.*, 2013). Cada teoria proposta envolve a condução de sinais nociceptivos ao sistema nervoso central (Byers e Narhi, 1999). E está diretamente relacionada com a resposta inflamatória do tecido frente a lesão. Injúrias na polpa dental podem acontecer por causa de 3 principais fatores: mecânicos, químicos ou irritantes microbianos, essas situações e/ou agentes ativam vários tipos de resposta inflamatória no local da injúria (Smith, 2002; Hahn and Liewehr, 2007; Yu and Abbott, 2007).

A possibilidade da regeneração fisiológica da polpa é restrita a vários fatores. Embora o tecido pulpar seja ricamente vascularizado, em comparação com outros tecidos do corpo o fluxo sanguíneo é reduzido devido à anatomia da câmara pulpar. Dessa forma, o baixo suprimento sanguíneo da polpa prejudica a habilidade do sistema

imune em combater as infecções e/ou injúrias(Hahn and Liewehr, 2007). Além disso, os odontoblastos são células pós-mitóticas, com limitada capacidade proliferativa, a competência da resposta reparadora ao dano pulpar é observada normalmente em casos de lesões superficiais de cárie, onde os odontoblastos possuem uma atividade secretora aumentada. Assim, em condições de prevenção, os odontoblastos secretam uma dentina terciária também conhecida, anatomicamente, como dentina reparadora, sendo essa pobremente organizada e menos mineralizada quando comparada com a dentina primária e secundária. A dentina terciária serve como barreira para proteger a polpa dos produtos ácidos produzidas pelas bactérias causadoras da cárie(Martens *et al.*, 2013; Couve *et al.*, 2014).

Como dito anteriormente, a dentina possui uma estrutura tubular que está intimamente relacionada com o tecido da polpa através dos prolongamentos odontoblástico. No entanto, quando o dente sofre uma injúria grave como um trauma, fator físico de inflamação da polpa, ou a formação de uma cavidade mais profunda por lesão de cárie, os odontoblastos podem sucumbir ou perder a capacidade secretora devido à gravidade da lesão. Assim, essas lesões mais graves podem levar a polpa a uma inflamação irreversível, gerando, possivelmente, um processo necrótico. Geralmente tratamentos endodônticos convencionais são indicados nestas situações. Apesar dos resultados positivos com os tratamentos endodônticos, que são amplamente utilizados no mundo todo, existem desvantagens significativas, como por exemplo, à perda significativa de dentina, deixando como sequela para a vida toda um dente não vital e enfraquecido. Sendo este problema especificamente crítico quando se trata de trauma dental em pacientes jovens com rizogênese incompleta, ou seja, dentes imaturos onde a raiz não está totalmente formada, ocorrência frequente na clínica odontológica.

A fim de evitar tais problemas, e com o objetivo de manter o dente vital, novas estratégias de tratamento vêm sendo desenvolvidas,

com base em princípios de engenharia de tecidos. Essas novas técnicas giram em torno da utilização de células-tronco semeadas em arcabouços, que além de servir de base para crescimento, migração e proliferação celular, também possibilita a difusão de moléculas e fatores de crescimento que irão atuar nos processos de diferenciação celular (Demarco *et al.*, 2011; Albuquerque *et al.*, 2014).

2.6 Uso das células tronco como terapia regenerativa do dente

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas, ou seja, não especializadas, com capacidade de auto-renovação e potencial de diferenciação. A auto-renovação é a capacidade que as CT têm de proliferar, gerando células idênticas às originais, enquanto que o potencial de diferenciação está relacionado com a capacidade das CT de, quando em condições favoráveis, gerar células com diferentes graus de especialização, ou seja, de diferentes tecidos (Rossant, 2011; Martens *et al.*, 2013; Mayo *et al.*, 2014). Pode-se classificar as CT quanto a sua origem e a sua potencialidade

Quanto a origem as CT são divididas em duas classes: células-tronco embrionárias, que são aquelas que derivam da massa celular interna do blastocisto; e as células-tronco adultas, que são encontradas em uma diversidade de tecidos no indivíduo adulto para reparação e manutenção tecidual (Rossant, 2011). Em relação à sua potencialidade as CT podem ser: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. As CT totipotentes são o único tipo de célula capaz de originar um organismo completo, apresentando a propriedade de gerar todos os tipos celulares presentes nos tecidos do organismo e anexos embrionários (Armstrong *et al.*, 2012). As CT pluripotentes são aquelas que possuem a capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) e seus derivados, dando origem a todos os demais tecidos do organismo. Por fim, as CT multipotentes, como as

mesenquimais, são células residentes, que atuam, principalmente, na renovação celular, podendo ser encontradas em vários tecidos, como por exemplo: medula óssea, cérebro, sangue, cordão umbilical e a polpa dental. (Mitsiadis *et al.*, 2011; Iohara *et al.*, 2013; Martens *et al.*, 2013).

2.7 Células-tronco de origem dental

Populações de células-tronco pós-natais foram identificadas na polpa de dentes permanentes humanos (DPSC, do inglês *Dental PulpStemCell*) por Gronthos e colaboradores (2000, 2002) dando início à utilização de um novo modelo de estudo para a diferenciação de células adultas *in vitro* e *in vivo*. Da mesma forma, observou-se que os remanescentes pulpare, derivados de dentes decíduos, também contem uma população de células-tronco pós-natais; sendo essas capazes de proliferação extensiva e diferenciação multipotencial, e foram denominadas de células-troco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED)(Miura *et al.*, 2003).

As CT conhecidas como DPSC e SHED demonstraram a habilidade de gerar um complexo semelhante à dentina quando co-implantadas com partículas de hidroxiapatita e fosfato de tricálcio no tecido subcutâneo de camundongos imunossuprimidos. Também foi relatado o desenvolvimento de áreas de tecido pulpar vascularizado, e uma camada alinhada à dentina mineralizada, com características de odontoblastos (Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003). Além disso, devido ao fato de que todos os constituintes do dente são derivados da interação ectomesenquimal, as células-tronco deste órgão são capazes de se diferenciar tanto em derivados mesodermis, como adipócitos e osteoblasto quanto ectodermis como neurônios (Duarte, 2013).

Baseado nisso, alguns estudos abordam a capacidade das CTPD de formar derivados neurais. Relatou-se assim, que as CTPD se diferenciaram em neurônios quando foram implantadas na região da medula em embriões de aves, assim como facilmente se diferenciam em células nervosas *in vitro* na presença de meio indutivo (Coura *et al.*, 2008; Arthur *et al.*, 2009; Maltman *et al.*, 2011; Martens *et al.*, 2014).

Todos estes estudos citados, acima, demonstraram que as CTPD possuem capacidade de diferenciação em linhagens celulares distintas, sendo, assim, uma candidata potencial para terapias clínicas. Uma excelente notícia publicada no dia 26 de janeiro de 2015, pelo **Diário Oficial da União**, relatando a Resolução 154/2015 do Conselho Federal de Odontologia, que normatiza o uso de células-tronco de origem odontológica no Brasil. Ficam regidos por esta resolução tanto os procedimentos de coleta, quanto de armazenamento dos tecidos e as atuais possibilidades de aplicação em humanos. Sem dúvidas esse é um grande avanço para as pesquisas envolvendo áreas como engenharia tecidual. Todavia, além do uso das células-tronco, também é primordial o conhecimento de materiais sintéticos, que possam ser utilizados como base para crescimento e diferenciação celular.

2.8 Polímeros utilizados na engenharia de tecidos dentais

Qualquer estratégia utilizada na engenharia tecidual requer o desenvolvimento de biomateriais compatíveis (Demarco *et al.*, 2011). Biomateriais são definidos como substâncias de origem natural ou sintética, biodegradáveis ou permanentes, que interagem com os sistemas biológicos. O objetivo da utilização desses é o tratamento, restauração ou substituição, de algum tecido ou órgão, restabelecendo, assim, a sua função e vitalidade (Park *et al.*, 2014). Alguns exemplos característicos de biomateriais são os polímeros

sintéticos, muito utilizados na área médica, para a fabricação de próteses, telas abdominais, enxertos, arcabouços, implantes mamários, lentes de contato, suturas, curativos, entre outros (Veleirinho, 2012).

Assim, novas estratégias para a regeneração da polpa dentária estão baseadas, e podem ser realizadas, através do desenvolvimento de biomateriais compatíveis com o tecido dental, que permita o crescimento e as interações células-células e que se adapte as diferentes dimensões da cavidade pulpar (Rosa *et al.*, 2011; Nakashima and Huang, 2013). Como em qualquer outro tecido, a engenharia de tecido pulpar, exige a associação de células em microambiente favorável para adesão, crescimento, proliferação, diferenciação e interação das células com o tecido do paciente. Baseado nisso os arcabouços são estruturas tridimensionais que proporcionam um ambiente inicial para o crescimento destas células, que também pode ser utilizado para a liberação de moléculas e fatores morfogenéticos, melhorando o desempenho celular (Albuquerque *et al.*, 2014; Syed-Picard *et al.*, 2014).

O papel do arcabouço tem se tornado crítico na odontologia pela dificuldade de se obter um material que seja maleável o suficiente que se ajuste as condições estruturais da raiz permitindo, dessa forma, o recrutamento de vasos sanguíneos e inervações, que penetram na polpa pelo forame apical, sendo essas características fundamentais para que tenha anastomose com o tecido neoformado (Albuquerque *et al.*, 2014; Syed-Picard *et al.*, 2014). Assim, os arcabouços são peças chave para a transposição dos resultados em laboratório para a clínica (Demarco *et al.*, 2011). Atualmente, os polímeros têm gerado muitos subsídios sobre mecanismo celulares e moleculares envolvendo células-tronco de polpa dental. Neste contexto, um material amplamente utilizado é o ácido poli-L-lático, (PLLA da sigla em inglês *Poly-L-Lactic Acid*). O modelo de fatia dental/arcabouço, desenvolvido por Cordeiro e colaboradores (2008)

utiliza o PLLA como arcabouço, e tem se tornado um modelo promissor e muito utilizado para o estudo dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na engenharia da polpa dental (Nor, 2006; Cordeiro *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2011; Albuquerque *et al.*, 2014). Nesse modelo, fatias obtidas de terceiros molares recém-extraídos, passam pelo processo de remoção da polpa da cavidade pulpar, posteriormente a cavidade é recoberta por cloreto de sódio e PLLA dissolvido em clorofórmio. Após a polimerização do PLLA, remove-se o sal do conjunto fatia/arcabouço, através de lavagem com PBS, sendo esse processo necessário para criar a porosidade requerida para semear as células. Por fim esse arcabouço, com ou sem a presença a presença de CT, e implantando no tecido subcutâneo do dorso de camundongos (Cordeiro *et al.*, 2008). Esta abordagem permite a manipulação genética das células antes de sua implantação, bem como, permite testar o efeito de diferentes populações celulares no tecido pulpar da engenharia de tecidos (Cordeiro *et al.*, 2008; Demarco *et al.*, 2011; Sakai *et al.*, 2011).

Além dessa técnica descrita acima, outra abordagem emprega o copolímero ácido láctico-co-ácido glicólico, (PLGA do inglês *Poly-Lactic-co-Glycolic Acid*) como arcabouço. Neste caso pode-se controlar a taxa de degradação e incorporar moléculas de liberação controlada. Através dessa abordagem é possível avaliar os efeitos de diferentes fatores de crescimento no metabolismo e diferenciação celular, bem como estabelecer condições ótimas para o desenvolvimento do tecido, como concentração e tempo de exposição aos fatores morfogenéticos (Murphy *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2010).

Os arcabouços não são muito utilizados na prática clínica devido à dificuldade estrutural da extensão do canal radicular ser alcançada pelo polímero. Nestes casos, o desenvolvimento de arcabouços injetáveis surgir como uma estratégia viável e atrativa. Vários arcabouços injetáveis têm sido propostos, como os hidrogéis,

no propósito da engenharia tecidual da polpa dental (Rosa *et al.*, 2013). Estes arcabouços, além de se adaptar à cavidade pulpar, têm mostrado promover crescimento e diferenciação de células-tronco. Um estudo recente, produzido por Rosa e colaboradores (2013) demonstrou um resultado promissor no que se diz a produção de polpa dental por engenharia tecidual utilizando arcabouços injetáveis. Após a suspensão de SHED em arcabouços, o conjunto foi injetado em raízes de dentes humanos e, posteriormente, implantado no tecido subcutâneo de camundongos. Após 35 dias, foi encontrado um tecido semelhante à polpa dental, sugerindo que as células-tronco se diferenciaram em odontoblastos funcionais, com capacidade de produzir novas camadas de dentinas (Sakai *et al.*, 2011). Para reduzir a manipulação *in vitro* das células a serem implantadas, novos métodos de cultura celular, em 3D estão sendo utilizados para aplicação na engenharia de tecidos dentais. Syed-Picard e colaboradores em 2014 realizaram experimentos com cultura de DPCS em placas recobertas com silicone, e transferiram essa cultura 3D para a cavidade radicular, logo após implantaram no dorso de animais, tendo como resultado um tecido semelhante à polpa, com células diferenciadas em odontoblastos capazes de secretar dentina, e vascularização.

Embora estes resultados tenham sido descritos apenas em ensaios laboratoriais, o desenvolvimento de arcabouços adequados é inquestionavelmente um passo crítico para a aplicação da engenharia de tecido pulpar na prática clínica (Rosa *et al.*, 2013).

3. Proposição

Trabalhos prévios com a utilização de células-tronco pós-natais, tais como DSPC e SHED, apontaram para novas possibilidades em terapias celulares, visando o desenvolvimento de novos tecidos. Além disso, o estabelecimento de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* tem permitido avaliar tanto a diferenciação e crescimento de fibras nervosas, quanto à eficiência de moléculas neuroatrativas na promoção de um tecido innervado. Cordeiro e colaboradores (2008) conseguiram gerar através de técnicas de engenharia de tecidos um tecido semelhante à polpa dental, utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar. Nesse trabalho, as SHED diferenciadas em odontoblastos foram capazes de secretar e mineralizar matriz dentinária. Além disso, o tecido neoformado também apresentou um padrão de vascularização semelhante ao encontrado na polpa dental, demonstrando, por imunomarcagem, que as células-tronco de dentes decíduos também se diferenciaram em células endoteliais e não somente em odontoblastos. Esse trabalho pioneiro, do nosso grupo de pesquisa, foi de grande importância para um melhor entendimento dos eventos celulares e moleculares envolvidos na engenharia de um tecido pulpar celularizado e vascularizado. Entretanto, para mimetizar completamente o tecido pulpar, morfofuncionalmente, o estudo da neurogênese do tecido também precisa ser realizado.

Até o momento não foi encontrado na literatura nenhum outro trabalho utilizando a mesma metodologia visando compreender os eventos relacionados com o desenvolvimento de um tecido pulpar innervado. Desta forma, justifica-se a realização de investigações adicionais para que esses aspectos sejam esclarecidos, visto que abordagens envolvendo a utilização de células apropriadas, matrizes condutivas e fatores de crescimento, permitirão um melhor entendimento do crescimento e migração de fibras nervosas e

diferenciação celular. É importante salientar que o trabalho também é pioneiro no desenvolvimento dessa metodologia que foi conduzida pela primeira vez em animais não imunossuprimidos, como consequência a resposta do hospedeiro aos implantes (fatia dental/arcabouço/células) também será demonstrada de forma inédita.

Logo, estas abordagens poderão possibilitar o desenvolvimento de ferramentas moleculares e alternativas terapêuticas viáveis para a regeneração de tecidos pulpaes danificados, regenerando sua estrutura como um todo, bem como sua função e vitalidade.

A fundamentação teórica e as argumentações acima baseadas na literatura conferem suporte à hipótese do presente estudo: considerando que através da técnica de engenharia de tecidos já foi possível obter, a partir da diferenciação de SHED, um tecido pulpar funcional e vascularizado, e levando em consideração que a inervação da polpa segue o mesmo trajeto dos vasos sanguíneos, é possível sugerir também a possibilidade de se mimetizar *in vivo*, o crescimento, a migração e a diferenciação de fibras nervosas, para o desenvolvimento de um tecido pulpar inervado utilizando como metodologia o modelo de Fatia Dental/ Arcabouço na engenharia de Tecido Pulpar em camundongos não imunossuprimidos.

4. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é verificar o possível desenvolvimento de polpas dentais inervadas utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar, implantados no subcutâneo do dorso de camundongos não imunossuprimidos.

4.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar se ocorre neurogênese espontânea em fatias dentais/arcabouços semeados com células-tronco de polpa de dentes decíduos (SHED), implantados no subcutâneo do dorso de camundongos;
2. Descrever morfolologicamente as estruturas nervosas no tecido neoformado;
3. Discutir os resultados encontrados, de forma a contribuir com os dados encontrados na literatura.

5 Material e métodos

5.1 Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi submetido para apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob parecer nº 216.371, de 11/03/2013. Todos os participantes desta pesquisa foram esclarecidos sobre os objetivos do projeto e autorizaram a coleta dos seus dentes através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice1**). O uso de animais para o desenvolvimento da pesquisa teve a aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC, ofício nº 032/CEUA/PROPESQ/2013.

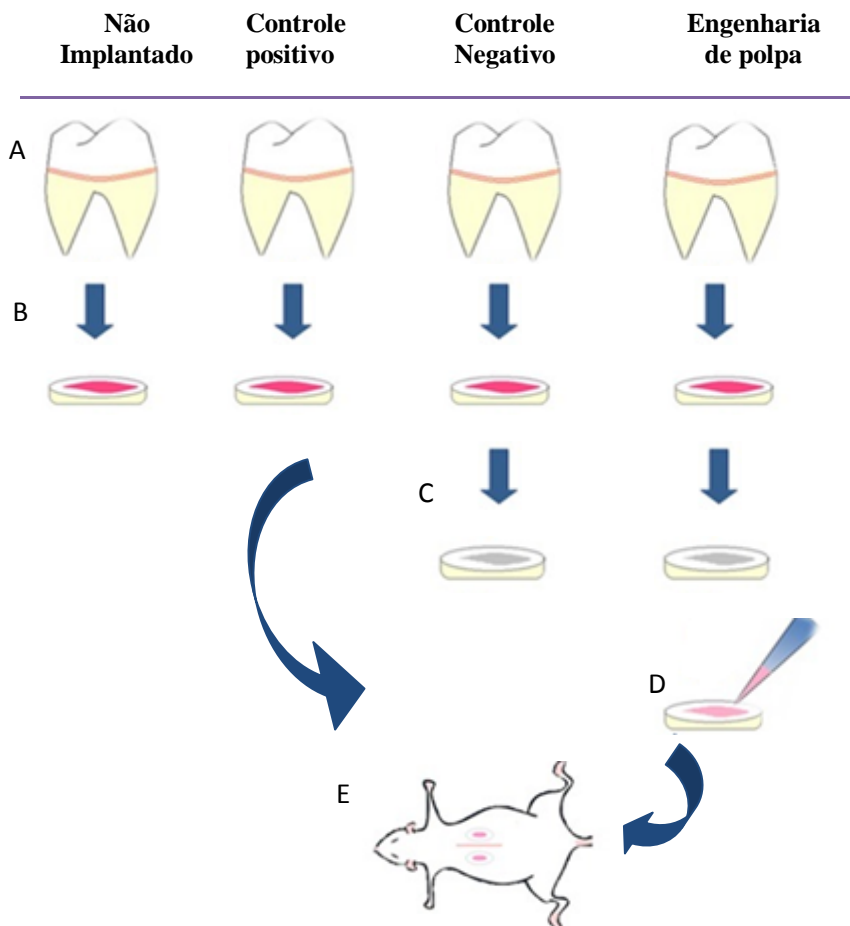
5.2 Considerações gerais

Os procedimentos experimentais consistiram em quatro etapas: I. Coleta e limpeza dos dentes; II. Cultura de células-tronco de polpa dental de dentes decíduos (SHED); III. Preparação do Modelo Fatia Dental-Arcabouço; e IV. Implante das fatias no subcutâneo do dorso de camundongos da espécie *Mus musculus*.

Os procedimentos foram conduzidos em quatro grupos: Não implantado, controle positivo, controle negativo e engenharia de tecido pulpar (Figura 7). A fatia não implantada consistiu no corte da fatia dental de terceiro molar hígido e sua imediata fixação e processamento histológico sem passar pelo processo de implante no dorso dos animais. O controle positivo consistiu da implantação imediata de fatias dentais obtidas de terceiros molares recém-extraídos, no dorso dos animais. Já o controle negativo, as fatias

dentais tiveram as cavidades pulpares esvaziada e posteriormente preenchidas com um polímero sintético (PLLA), e então implantadas no dorso dos camundongos, sem a semeadura de células. Por fim, no grupo experimental (engenharia de tecido pulpar), as fatias dentais tiveram a cavidade pulpar esvaziada, sem haver contato com as paredes de pré-dentina, e então preenchida com o polímero sintético (PLLA), seguida da semeadura de células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED) resuspensas em uma proporção de 1:1 de Matrigel, sendo posteriormente implantadas no subcutâneo da região dorsal de camundongos machos, de linhagem *Mus musculus*, com idades entre 5 e 7 semanas. Todos os grupos foram monitorados em tempos de 21, 28, 36 ou 65 dias decorridos a partir da data do implante.

Figura 7: Esquema ilustrativo dos procedimentos nos grupos controle positivo, controle negativo e engenharia pulpar (teste). A) Terceiros molares hígidos extraídos, B) Fatias dentais com a polpa dental original, C) Fatias dentais com a cavidade pulpar substituída por um polímero, D) Fatia dental com cavidade pulpar substituída por polímero, funcionando como arcabouço para a inoculação das células-tronco de origem da polpa dental de dentes decíduos (SHED), E) Implante bilateral do Modelo Fatia Dental/Arcabouço no tecido subcutâneo do dorso de camundongos. Com exceção do grupo não implantado (dia 0), todos os outros grupos foram analisados em 21, 28,36 e 65 dias.



Fonte: do autor.

5.3 Cultura Celular

Neste estudo, foram utilizadas células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED), de passagem 4, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruno Neves Cavalcanti (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil). As SHED foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Invitrogen), baixa glucose, suplementado com 20% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Gibco, Invitrogen) e solução de penicilina e estreptomicina 1% (PB, do inglês *Penicillin-Streptomycin*, Gibco, Invitrogen), e incubadas em estufa (Ultrasafe, HF212 UV, Biosystems) a 5% de CO₂, com temperatura controlada a 37°C ao longo de todo o experimento, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias.

Após atingir 80% de confluência em cultura, as células eram submetidas ao protocolo de passagem envolvendo tripsinização e centrifugação, e então, seu volume distribuído em garrafas de cultura celular de 175 cm² em uma proporção de 1:3. Este procedimento foi realizado até obter quantidade de células suficiente para semear nos arcabouços.

5.4 Obtenção dos dentes

Os dentes utilizados no estudo foram obtidos em colaboração com o Centro de Especialidades Odontológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CEO/UFSC). Nesta pesquisa foram usados terceiros molares hígidos, de pacientes com faixa etária de 15 a 30 anos, com indicação de exodontia por motivos alheios a esta pesquisa, os quais foram coletados somente após doação e assinatura

do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice1**) por parte dos pacientes.

Imediatamente após a exodontia, os dentes foram transportados ao laboratório, em tubos de polipropileno (tipo Falcon, estéril) com solução de transporte contendo meio de cultura padrão *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Gibco, Invitrogen) suplementado com soro fetal bovino 20% (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Gibco, Invitrogen) e solução de Penicilina e Estreptomicina 1% (*Penicillin; Streptomycin*, Gibco, Invitrogen) e Fungizona 1% (*Amphotericin B* 250µg/ml, Gibco, Invitrogen), a 4°C. O transporte foi realizado em caixas isotérmicas para manutenção da temperatura. Os tecidos moles presentes na superfície radicular do dente foram removidos com auxílio de uma cureta e gaze embebida em solução de etanol 70%.

5.5 Preparação das fatias dentárias

Após a realização do processo de limpeza da superfície externa, com o objetivo de se obter fatias dentais com 1 mm de espessura e cavidade pulpar com aproximadamente 29–43 mm de diâmetro, os dentes foram seccionados transversalmente na região cervical, com disco diamantado, em baixa velocidade (SYJ-150 *Digital LowSpeed Diamond Saw*, MTI corporation®) sobrefrigeração constante com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, Invitrogen) a 4°C, conforme descrito em trabalhos prévios do nosso grupo (Cordeiro *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2010).

A polpa das fatias dentais destinadas aos grupos teste e controle negativo foram removidas com o auxílio de uma sonda clínica, sem danificar a camada de pré-dentina e as fatias foram, então, armazenadas em PBS, para posterior preparação dos arcabouços (Cordeiro *et al.*, 2008 ; Sakai *et al.*, 2011). As fatias do

grupo controle positivo, foram obtidas de dentes recém-extraídos, imediatamente seccionados e armazenados em meio de cultura padrão DMEM, suplementado com 20% de soro bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina para implante no subcutâneo do dorso dos animais, no mesmo dia. A fatia dental do grupo não implantado (dia 0) foi fixada em formalina 10% durante 24h imediatamente após o seccionamento e encaminhada para processamento histológico de rotina.

5.6 Preparação dos arcabouços

Anteriormente ao preparo dos arcabouços, o polímero sintético ácido poli-L-lático (PLLA) (Resomer® L 207 S, Poli- L- lático-co-ε-caprolactona, Evonik Industries AG Pharma Polymers, Alemanha), foi dissolvido em clorofórmio (Merck, Alemanha) em uma concentração de 500mg/ml e deixado *overnight* para solubilizar.

As fatias armazenadas em PBS, pertencentes aos grupos controle negativo e teste, tiveram a cavidade pulpar preenchida com partículas de tamanho entre 250 a 425 µm de cloreto de sódio. Posteriormente, o PLLA dissolvido em clorofórmio foi gotejado sobre o sal até sua completa absorção, como descrito previamente por Nör e colaboradores, em 2001, tomando o cuidado de não sobrepor as camadas de pré-dentina e dentina, como relatado por Cordeiro e colaboradores, em 2008. As fatias foram deixadas em repouso durante 16 a 18 horas para polimerização do PLLA. Após a polimerização, o sal foi removido por meio de sucessivas lavagens com PBS durante uma semana, até a obtenção de um arcabouço biodegradável altamente poroso. O conjunto fatia dental/arcabouço foi então desinfetado e hidrofiliado em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) durante 10 minutos em cada solução, por fim lavadas com PBS estéril onde foram mantidas em temperatura de 4°C para posterior implantação nos animais, no dia

seguinte. As fatias dentais, destinadas ao grupode engenharia tecidual, foram retiradas da geladeira, lavadas com PBS, e armazenadas em placas de 28 poços para receber as SHED mantidas em cultura.

5.7 Inoculação das células-tronco nas fatias dentais com arcabouço

Para a semeadura das células e posterior implantação nos camundongos foi utilizado o protocolo previamente padronizado pelo nosso grupo (Cordeiro *et al.*, 2008). As SHED foram tripsinizadas e contadas com auxílio de uma Câmara de Neubauer com o objetivo de semear 1×10^6 células por arcabouço. O volume celular equivalente, calculado, foi centrifugado e resuspenso em uma mistura de 1:1 de Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, EUA) e meio de cultura celular, totalizando 18 μ L, volume suficiente para cobrir todo o arcabouço sem extravasar para os bordos da dentina.

O conjunto fatia dental/arcabouço com células-tronco, foi incubado a 37°C, durante 30 minutos, para permitir a gelificação do Matrigel e, posteriormente, foi implantado no subcutâneo do dorso dos animais.

5.8 Implante do conjunto Fatia Dental/Arcabouço no dorso dos animais

Camundongos machos da linhagem *Mus musculus* procedentes do Biotério Central da UFSC, com 5 a 7 semanas de idade e peso entre 35 e 40g, foram ambientados no Biotério Neonatal Experimental (BEG/CCB/UFSC) por uma semana antes dos experimentos, sob condições de temperatura e umidade padronizadas

além de acesso à ração e à água *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12/12 horas.

Os animais foram submetidos a uma anestesia intramuscular com associação de 85% de quetamina (4,25mg/kg, Syntec) e 15% de xilazina (0,25 mg/kg, Syntec) e tricotomia da região a ser operada. A área foi então limpa com solução a base de polivinilpirrolidona iodo (PVP-I) em solução aquosa, contendo 1% de iodo ativo (Riodeine). Foi realizada uma incisão longitudinal, no sentido craniocaudal, de aproximadamente 2 cm de comprimento, com auxílio de bisturi com lâmina nº 15 acoplada, até atingir o tecido subcutâneo do dorso do camundongo. O tecido foi divulsionado a fim de criar o espaço necessário para acomodar as fatias dentais, obedecendo a uma distância de 1 cm à linha de incisão. As bordas da incisão foram aproximadas e suturadas com fio de nylon 5.0 (Figura8).

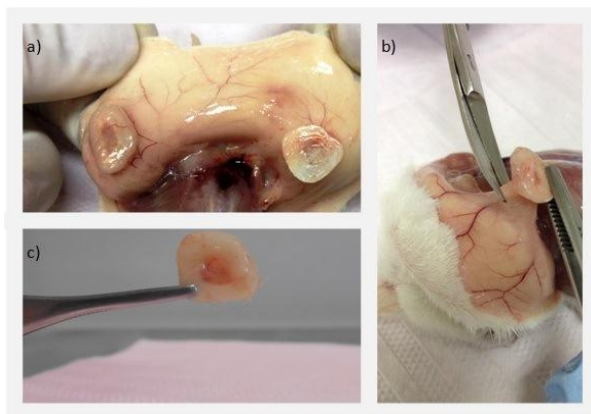
Figura 8: Sequência cirúrgica para implantação do modelo de estudo.

a) Tricotomia do local da incisão, b) Assepsia da área com PVPI, c) Preparação do espaço subcutâneo que receberá as fatias dentais, d) Modelo Fatia dental/arca-bouço/células-tronco semeadas prontas para serem implantadas, e) Direcionamento da fatia dental no dorso do animal, f) Posicionamento do implante, g) União das bordas da incisão para a sutura, h) Animal pós-operado.



Decorridos 21, 28, 36 e 65 dias do implante, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Após completa perda dos sinais vitais, foi realizada uma secção na porção caudal e lateral do dorso dos animais possibilitando rebatertoda a pele dorsal, expondo o subcutâneo com os implantes.As amostras foram então recuperadas com auxílio de uma pinça, com cuidado de não tocar no tecido neoformado (Figura 9) e imediatamente colocados em solução de formaldeído 10% (diluído em água destilada), para fixação das estruturas, durante 24h. Posteriormente à fixação, foi iniciada a etapa de desmineralização da dentina. As amostras, então, foram armazenas em placas de 12 poços com 3 ml de solução desmineralizante de ácido fórmico 10% (diluído em água destilada), até que não oferecessem resistência ao teste da ponta do alfinete, ou seja, quando um alfinete facilmente penetrava a dentina da amostra.

Figura 9: Remoção das amostras da região dorsal do camundongo. a) A pele da região dorsal é rebatida, expondo as fatias implantadas, b) Retirada dos implantes com auxílio de pinça e tesoura, c) Fatia dental do controle positivo com 65 dias, onde podem ser observados vasos sanguíneos na fatia dental encapsulada.



5.8 Análises histológicas

Concluída a etapa de desmineralização, as fatias foram então mergulhadas em água corrente, durante 5 minutos, com a finalidade de retirar o ácido das amostras, e preservadas em solução etanólica 70% até o início do processamento histológico. O protocolo utilizado foi adaptado, de Ribeiro e colaboradores (2012), para melhor processamento da amostra. As fatias foram primeiramente desidratadas em dois banhos de 45 minutos de etanol 90%, em seguida, foram mantidas durante 60 minutos em etanol absoluto e durante 30 minutos em um novo banho de etanol absoluto. A etapa de diafanização, ou clareamento, foi feita com dois banhos de xilol, de trinta minutos cada. A inclusão em parafina foi realizada com trocas entre três banhos de 60 minutos, sendo o último deles para posicionar e montar o bloco histológico. Cortes de 4 µm foram feitos em micrótomo (Olympus CUT 4060). Foram obtidas cinco lâminas com três cortes cada, onde duas foram destinadas para a coloração convencional com hematoxilina e eosina (HE) e as outras três (silanizadas) destinadas para a técnica de imuno-histoquímica.

5.9 Coloração histológica Hematoxilina de Harris e Eosina amarelada (HE)

As lâminas destinadas ao método dicrômico de coloração (HE) foram utilizadas para controle histológico, visando evidenciar a qualidade morfológica do tecido. Estas lâminas foram desparafinizadas com dois banhos consecutivos de xilol, um de 15 minutos, seguido de outro de 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram rehidratadas em uma série decrescente de solução de etanol (100%, 90%, 70%) por 5 minutos cada, seguida de lavagem em água corrente. Logo após, as lâminas foram banhadas em hematoxilina de

Harris (Merck) por 5 minutos e lavadas em água corrente durante 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina amarelada (Vetec) durante 30 segundos e lavadas em água corrente durante 2 minutos. Por fim, procedeu-se a desidratação em sequência etanólica crescente, do álcool 70% ao absoluto 100%, todos durante 5 minutos, finalizando com dois banhos consecutivos de 5 minutos de xilol.

Finalmente, as lâminas foram montadas com meio de montagem (Permout), deixadas em repouso “*overnight*” e então analisadas por microscopia de luz utilizando um microscópio Olympus BX41.

5.9 Imuno-histoquímica

Para a realização da análise imuno-histoquímica, as lâminas silanizadas (Amitel), onde os cortes das fatias dentais foram posicionados, foram mantidas em estufa a uma temperatura de 60°C, durante 30 minutos, até completa fusão de parafina ao redor dos cortes teciduais. Logo após, foi realizada a técnica de desparafinização das lâminas através de 2 banhos de xilol consecutivos, o primeiro de 15 minutos seguido de outro de 5 minutos. Posteriormente, o processo de hidratação dos cortes foi realizado através de sucessivos banhos em soluções decrescentes de etanol de 100%, 90%, 70% e, por fim, foi realizada uma passagem em água destilada. Imediatamente após a hidratação, as lâminas foram imersas em solução de tampão citrato 0,01M, PH 6,0 por 40 minutos em banho-maria com temperatura constante entre 95-98°C para a reativação antigênica. Em seguida, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente durante 20 minutos e lavadas em dois banhos com PBS, 5 minutos cada. Logo após, foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas, com objetivo de eliminar reações inespecíficas, mergulhando as lâminas em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% em metanol, durante 20 minutos,

repetindo os dois banhos com PBS de 5 minutos cada. Posteriormente, foi conduzido o bloqueio das ligações inespecíficas através da incubação das lâminas em solução de PBS contendo 5% de soro fetal bovino, durante 40 minutos, seguido de lavagens com PBS (2x5 minutos).

Para a imunodeteção foram utilizados os anticorpos primários contra os antígenos humanos beta-tubulina III, receptor do fator de crescimento neural (P75), e molécula de adesão celular neural (NCAM), os anticorpos foram incubados nas concentrações contidas na Tabela 1, e as lâminas foram mantidas em câmara úmida *overnight*, a uma temperatura de 4°C.

No dia seguinte, as lâminas passaram por duas lavagens consecutivas de PBS, de 10 minutos cada. Logo após, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado universal (Biotinylated link, LSAB2 System-HRP, Dako) durante 30 minutos, seguido por lavagens em PBS e posterior incubação com o complexo streptavidina-peroxidase (Streptavidin-HRP, LSAB2 System-HRP, Dako) por mais 30 minutos. Por fim, a revelação foi feita com solução cromógena DAB (3,3'; diaminobenzidina) e tampão substrato (LiquidDAB+Substratechromogen System, Dako), seguidas de contracoloração com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich). As lâminas foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 100%, 100%, xilol e xilol), por 5 minutos cada, montadas com Permount®, analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Olympus IX71) com sistema de captura de imagem (QCapture Pro).

Tabela 1: Anticorpos utilizados para a Imuno-histoquímica

Especificações	Nome	Marca/Código	Diluições
Anticorpo primário	Anti betatubulina III	Abcam/ab18207	1/1000
Anticorpo primário	Molécula de adesão celular neural (N-CAM)	Abcam/ab9018	1/100
Anticorpo primário	Receptor do fator de crescimento neural P75	Abcam/EP1038Y	1/100

5.10 Análise microscópica

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz com objetivas 4X, 10X e 40X, percorrendo toda a extensão do tecido e observando as características morfológicas microscópicas do tecido formado comparando-os com seus respectivos controles. Para as estruturas de interesse (inervação), foram realizadas microfotografias em magnificação de 1000X, de modo a permitir uma melhor visualização e descrição dos achados.

Tentou-se a quantificação da imunomarcção obtida nas amostras submetidas à imuno-histoquímica, por meio de contagem visual e/ou análise com *softwareImage J* (*NationalInstitutesof Health*, EUA), entretanto, a presença de restos de arcabouços

impediu a obtenção de contagens confiáveis que permitissem uma posterior análise estatística dos dados. Por este motivo, optou-se por realizar a descrição morfológica dos achados, o que permitiria atingir os objetivos desta pesquisa, quais sejam, verificar a possibilidade de inervação no tecido pulpar formado por engenharia tecidual. Além disso, foi criada uma tabela de escores, de acordo com a intensidade e quantidade de imunomarcações obtidas com os diferentes anticorpos nos diferentes grupos experimentais (Tabela 2).

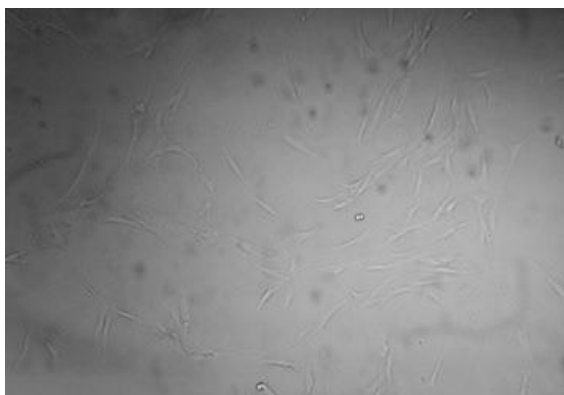
6 Resultados

6.1 Análise morfológica das SHED em cultura

No presente trabalho, as células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos foram cultivadas até a passagem 4 para aplicação nos experimentos. As culturas levaram em média 2 semanas para atingir confluência em frasco de cultura de 175 cm², sendo o meio padrão de DMEM suplementado trocado a cada 48 horas. As células mantiveram o mesmo aspecto fibroblastóide desde seu recebimento até o momento de serem semeadas nas fatias dentais/arcabouço (Figura 10).

Com o objetivo de manter as SHED em um estado mais indiferenciado, optou-se por não usar o meio α -MEM, pois na sua formulação pode conter ácido ascórbico, que pode influenciar as células a se diferenciarem (Leon *et al.*, 2007; Mimoriet *al.*, 2007; Kermaniet *al.*, 2014).

Figura 10: Fotomicrografia de SHED em cultura. SHED apresentando aspecto fibroblastóide, 4 dias após passagem. Células mantidas em meio de cultura DMEM acrescido de 20% de SFB e 1% de PS.



6.2 Estudo piloto

Este foi o primeiro estudo utilizando o Modelo Fatia Dental/Arcabouço, em que as fatias controle e experimentais foram implantadas em camundongos não imunossuprimidos. Além disso, foi a primeira vez que o Modelo foi executado no Brasil. Deste modo, era imperativo realizar, não somente um estudo piloto padrão para verificação da viabilidade da metodologia proposta, mas, primariamente, da possibilidade de implantar fatias de dentes humanos e células de origem humana em animais não imunossuprimidos sem a ocorrência de reações do tipo implante contra o hospedeiro ou, até mesmo, do hospedeiro contra o implante.

Deste modo, foram realizados três estudos pilotos para adequação da metodologia à realidade brasileira, e que serviram, também para avaliar a resposta do hospedeiro ao implante e do implante ao hospedeiro.

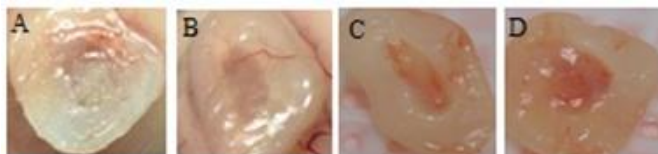
Durante todo o tempo de implantação no subcutâneo do dorso dos camundongos, nos períodos dos estudos piloto e, posteriormente, nos experimentais, não foram observadas alterações na superfície epitelial no local do implante (como edema, vermelhidão, pus, etc.), abertura da sutura, bem como nenhuma alteração de comportamento, de padrão alimentar ou perda de peso dos animais, indicando a viabilidade da implantação.

6.3 Aspectomacrosscópico das fatias dentais recuperadas do implante

No momento da recuperação das fatias dentais implantadas observou-se um aspecto pálido das amostras do grupo controle negativo (arcabouço sem células) em comparação com o grupo teste

(arcabouço + SHED) e o grupo controle positivo (polpa original) (Figura 11A-D). Nestes dois últimos, era bastante evidente a confluência de vasos sanguíneos para o tecido neoformado no interior das fatias dentais (Figura 11).

Figura 11: Fatias dentais recuperadas após 65 dias deimplante no subcutâneo dorso de camundongos não imunossuprimidos. (A) Controle negativo, (B) Polpa neoformada, (C) Polpa neoformada, (D) Controle positivo.



6.4 Análise Microscópica das Fatias Dentais

Imediatamente após a remoção das fatias dentais do dorso dos animais, as mesmas foram fixadas, desmineralizadas e, então, submetidas ao processamento histológico em parafina para obtenção de cortes de 4 μm de espessura que foram encaminhados para as etapas de coloração histológica com hematoxilina e eosina e para a técnica de imuno-histoquímica, a fatia dental não implantada foi submetida a fixação e desmineralização logo após ao corte.

Nas análises histológicas com HE, pode-se comparar o dia 0 (fatia não implantada, mostrada na figura 12) com as fatias implantadas observando-se a evolução do tecido de acordo com os tempos de 21, 28, 36 e 65 dias nos grupos de controle positivo, engenharia de polpa e controle negativo mostrados na Figura 13.

Em todos os grupos foi possível observar a presença de tecido conjuntivo, embora de qualidade diferente. No grupo com a polpa dental original não implantada é possível observar a presença de um

tecido conjuntivo frouxo, ricamente celularizado, contendo vasos sanguíneos e feixes nervosos que podem ser observados na figura 12, imagens a, b e c. O grupo controle positivo (polpa dental original, implantada) apresentou um tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado no interior da fatia, contendo vasos sanguíneos funcionais e camada de odontoblastos dispostos de maneira colunar e alinhados em contato com a pré-dentina, em todos os tempos avaliados (Figura 13 A-D). Ainda, foi possível identificar no controle positivo a presença de fibras nervosas mielinizadas destacadas na imagem A da Figura 14, e fascículo nervoso envolvido por uma camada de tecido conjuntivo frouxo (perineuro) destacado com uma seta nas imagens A e B da Figura 14.

Nos espécimes de engenharia de tecido pulpar (fatias implantadas com SHED), observou-se, ao longo dos tempos experimentais, que o arcabouço foi sendo gradativamente degradado e substituído por um tecido conjuntivo vascularizado. As células próximas à dentina estavam dispostas de maneira alongada ou cúbica (Figura 13E-H), lembrando uma camada de odontoblastos.

Por fim, nas fatias dentais do controle negativo (arcabouço sem células), a cavidade pulpar continha pouco tecido conjuntivo, sendo este muito desorganizado, pouco celularizado e sem organização de uma camada de células em contato direto com a pré-dentina. Nestes espécimes foi encontrada abundância de células semelhantes à adipócitos ocupando a maior parte do interior da cavidade pulpar (Figura 13 I-L).

Figura 12: Fotomicrografias do corte corados com HE tempo zero.Aspecto morfológico representativo da polpa dental do grupo não implantado tempo zero.a) Polpa dental em aumento de 10X, b) estrutura fascicular em aumento de 40X e em c) destaque em imersão, aumento de 100X de um feixe nervoso.

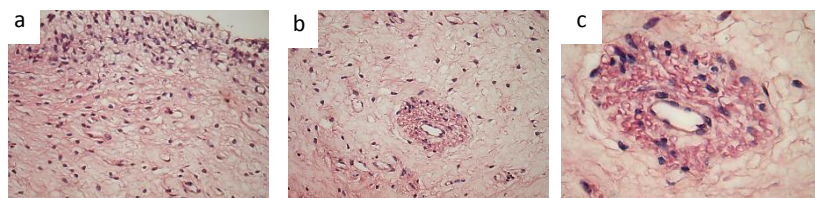


Figura 13: Fotomicrografias dos cortes corados com HE.Aspecto morfológico representativo das amostras dos grupos Controle Positivo, Engenharia de Polpa e Controle Negativo, em função dos tempos experimentais (21, 28, 36, e 65 dias).

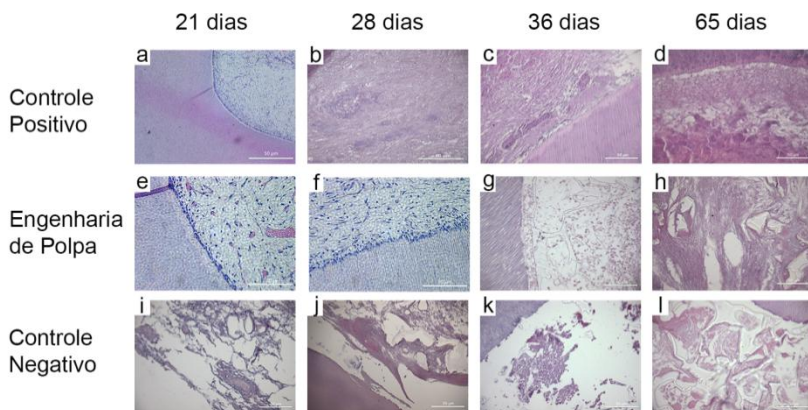
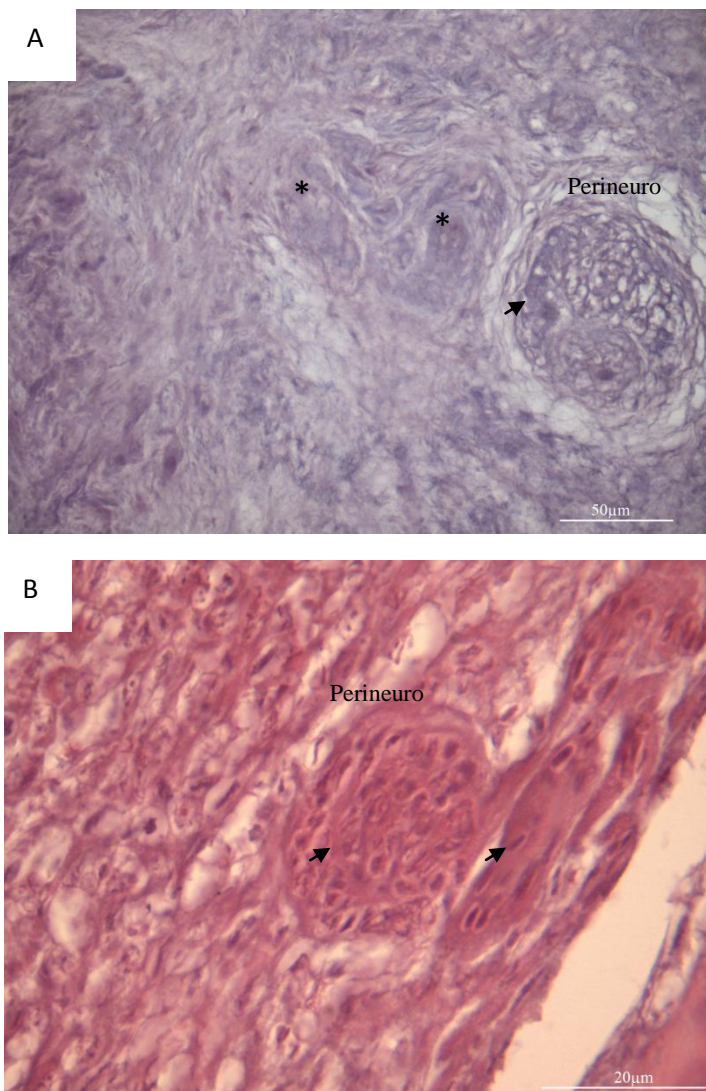


Figura 14: Fotomicrografias dos fascículos nervosos encontrados na polpa dental do controle positivo. (A) Controle positivo em 21 dias e, (B) Controle positivo 36 dias. Estrutura fascicular destacada com (*). A seta aponta para a bainha de mielina. Coloração: HE



6.5 Análise microscópica da marcação neuronal

Para verificar se os tecidos neoformados nas fatias dentais do grupo teste (engenharia de tecido pulpar) desenvolveram inervação, foram utilizados três marcadores neuronais específicos: Anti- β -Tubulina III, Anti-NCAM e Anti-P75. A quantificação da imulocalização das proteínas de escolha nesta pesquisa será mostrada em uma tabela de escores na forma de cruzes.

6.5.1 Imunomarcação com Anti- β -Tubulina III

Atubulina é uma proteína que constitui os microtúbulos do citoesqueleto; o tipo III é encontrado especificamente no citoesqueleto de neurônios e seus prolongamentos axonais. Em estágios de migração e crescimento neural, estas moléculas podem ser facilmente detectadas, sendo utilizadas como marcadores de terminações nervosas durante a trajetória axonal para os tecidos alvo (Cowan *et al.*, 1997; Martens *et al.*, 2013).

Dessa forma, justifica-se o uso deste anticorpo para as reações de imuno-histoquímicas realizadas neste trabalho. Na análise das amostras de todos os grupos foi possível observar a imunomarcação nos tecidos submetidos à técnica. Pontos isolados sugestivos de terminações nervosas livres ou em um arranjo típico de feixe nervoso (fascículos) foram mais fortemente marcadas, apresentando um tom acastanhado mais intenso. As microfotografias podem ser vistas nas Figuras 15 e 16 e 17.

No dia 0 (grupo não implantado) foi possível observar marcações pontuais, em grande quantidade, além disso, estruturas organizadas na forma de fascículos semelhantes a feixes nervosos também fortemente marcadas como pode ser observado nas

imagens, b e c da figura 15. Nas fatias de 21 dias, foram encontradas marcações pontuais, em grande quantidade no controle positivo, sendo sugestivo da presença de terminações nervosas livres (imagem A da Figura 16). Na comparação com os achados dos grupos teste e controle negativo, essas mesmas observações não foram identificadas. Nestes grupos, para este tempo experimental, ainda foi encontrada uma quantidade significativa de arcabouço, enquanto que, no controle negativo, o tecido estava bastante desorganizado e com muitas áreas vazias (imagens E e I da Figura 16).

No grupo controle positivo de 28 dias (item B da Figura 16), é possível identificar a marcação de terminações nervosas livres e organizadas em forma de feixes. No mesmo período de tempo, no grupo de engenharia tecidual, foi observada a presença de um tecido mais organizado, com imunomarcações pontuais em grande quantidade, sugerindo a presença de terminações nervosas livres (item F da Figura 16). Por fim, no grupo controle negativo, foram detectadas marcações escassas de β -tubulina-III em uma área que apresentava tecido conjuntivo, porém bastante desorganizado (item L da Figura 16).

Aos 36 dias, apesar de o tecido neoformado apresentar uma estrutura remanescente de arcabouço, pode-se visualizar um tecido organizado, com marcações pontuais, sugestivas de terminações livres em quantidade moderada, (imagem G da Figura 16), semelhantes às marcações identificadas nos controles positivos (item C, figura 16). Em contrapartida, no grupo controle negativo, pequena quantidade de tecido foi recuperada e nenhuma marcação pode ser identificada (item L da figura 16).

Por fim, no último tempo experimental (65 dias), foi possível constatar a presença de poucas marcações livres e de estruturas em forma de fascículos nervosos no controle positivo (Figura 16D e Figura 17A). Neste período, é importante ressaltar que, no grupo de

engenharia de tecido pulpar, ainda havia a presença de terminações nervosas livres (Figura 16H), porém já foram observadas estruturas organizadas em feixes (fascículos nervosos), semelhantes aos encontrados nas amostras de controle positivo (polpa original) (Figura 17B). Enquanto isso, no grupo controle negativo, apesar de o tecido se apresentar de forma desorganizada, foi possível detectar a presença de terminações nervosas envoltas por feixes de fibras colágenas (Figura 16L).

Figura 15: Fotomicrografia da imunolocalização de anti- β tubulina III na polpa do grupo não implantado (dia zero). Ema) polpa com terminações nervosas livres, fortemente marcada na região odontoblástica (aumento de 40X); b) Estrutura organizada na forma de feixe nervoso (aumento de 40X); c) destaque para o fascículo nervoso em imersão (aumento de 100X).

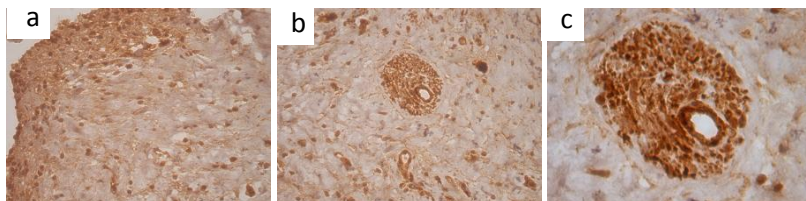


Figura 16: Fotomicrografias da imunolocalização de anti- β tubulina III nas fatias dentais em função dos grupos e tempos experimentais. Podendo ser observado um padrão de marcação entre os controles positivos (a-d) com presença de terminações nervosas livres (*) e feixes nervosos (F). O grupo engenharia de polpa em 21 dias foi observado quantidade significativa de arcabouço (A). A partir de 28 dias (f-h), imunomarcação de terminações nervosas livres (*) semelhante ao controle positivo e em (l) no controle negativo.

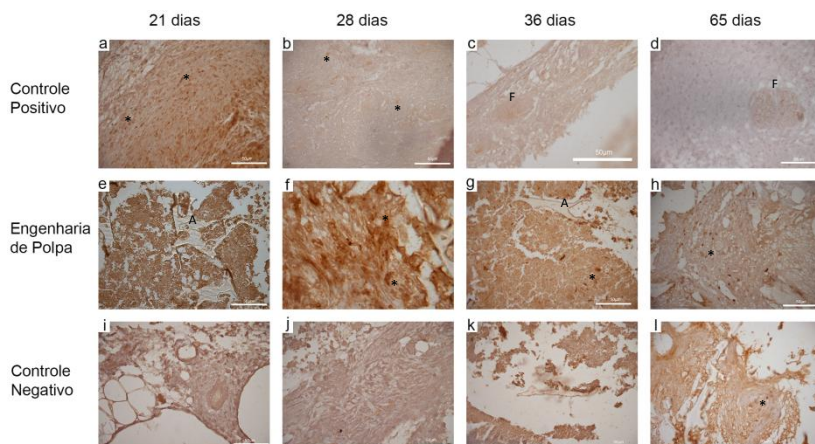
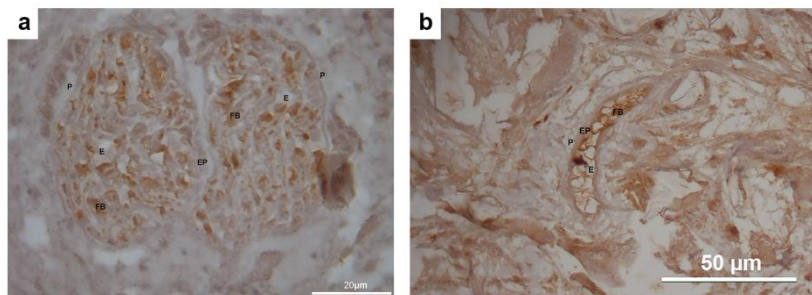


Figura 17: Fotomicrografia da imunolocalização de anti- β Tubulina

III. (a) Fascículos nervosos encontrados na polpa dental no grupo controle positivo de 65 dias. (b) Fascículo nervoso encontrado na polpa desenvolvida por engenharia tecidual no grupo de 65 dias. (EP) Epineuro, (P) Perineuro, (E) endoneuro, (FB) fibras nervosas.



6.5.2 Imunomarcção com NCAM

As moléculas de membrana celular são principalmente reconhecidas por mediar a adesão celular durante os processos de migração, proliferação e diferenciação celular. O primeiro membro de moléculas de adesão celular encontrado no sistema nervoso foi a NCAM. A habilidade das NCAMs em mediar adesão homofílica faz dela uma boa candidata para marcar a fasciculação neural no tecido alvo (Obara and Takeda, 1993; Cowan *et al.*, 1997) e, por isso, também foi usada como marcador neste estudo.

É possível observar que as marcações acontecem isoladas ou organizadas em arranjos, tipo feixes nervosos, semelhante ao marcador anterior. O diferencial é que neste caso, nas amostras de tecido pulpar neoformado foi possível visualizar estruturas semelhantes a vasos sanguíneos, circundadas por marcações pontuais de cor acastanhada, indicando a presença de uma terminação nervosa.

Neste caso, foi interessante observar o padrão de marcação encontrado nos grupos não implantados e controle positivo (ambos com a polpa original) e experimento (polpa neoformada por engenharia tecidual). Ao longo dos tempos experimentais, houve um incremento na imunomarcação no grupo de engenharia tecidual, com tom acastanhado mais intenso no grupo teste, a partir dos 28 dias. Aos 21 dias, o grupo de polpa neoformada não apresentou reação ao anticorpo NCAM. A partir dos 28 dias e até os 65 dias, observou-se um aumento gradativo na imunomarcação, com aspecto pontual (terminações livres) (Figura 18 E-H). Enquanto que, o grupo não implantado apresentou marcações pontuais indicando presença de terminações nervosas livres, porém mais fracamente marcadas quando comparado com a β -tubulina III, principalmente na região periférica do tecido (figura 19. a), além disso, as estruturas organizadas em feixes nervosos se mantiveram fortemente marcadas tal qual o marcador anterior (figura 19. b e c).

No grupo controle positivo, a imunodeteção foi mais acentuada apenas aos 65 dias, apresentando um aspecto mais difuso (Figura 18 A-D). Estas observações sugerem uma relação entre tempo de desenvolvimento e tempo de adesão e migração das terminações nervosas livres.

Já no controle negativo houve imunomarcação internalizada entre feixes de fibras colágenas, em áreas que apresentavam um pouco mais de tecido (Figura 18 I-L).

A Figura 20 mostra estruturas semelhantes à bainha de mielina em corte transversal de fascículos nervosos no grupo teste aos 28 e 65 dias, e no controle negativo de 65 dias.

Figura 18: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-NCAM.

Grupo Controle Positivo e Engenharia de Polpa, a partir de 28 dias, seguem o mesmo padrão de imunodeteção semelhante a terminações nervosas livres (*), também encontradas no grupo Controle Negativo 65 dias. (A) arcabouço.

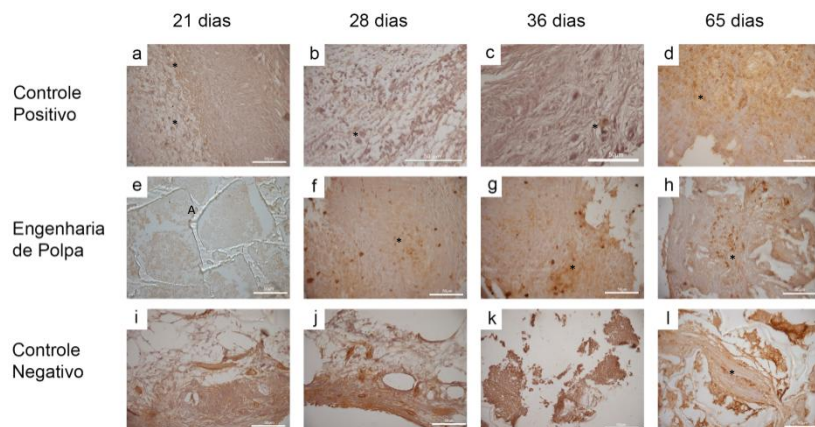


Figura 19: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-NCAM no grupo não implantado de polpa original. Em a) Observa-se poucas regiões com terminações nervosas livres na região subodontoblástica (aumento de 40x); b) Estruturas organizadas em fascículos fortemente marcadas em aumento de 40X; c) destaque para o fascículo nervoso em imersão (aumento de 100X).

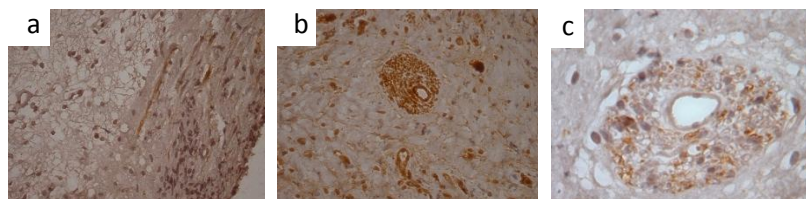
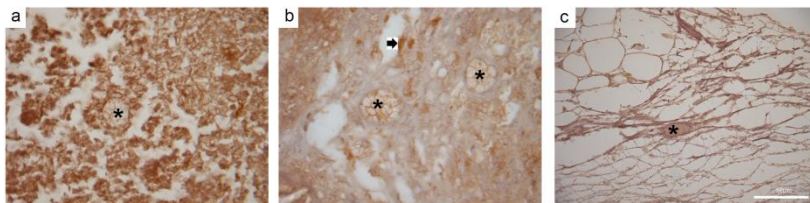


Figura 20: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-NCAM em fascículos nervosos.a) Estrutura fascicular (*) em corte transversal encontrada no grupo teste de 28 dias, b) estrutura fascicular nervosa (*) em visão transversal e fibras nervosas livres em torno dos vasos sanguíneos (seta), encontrada no grupo teste de 65 dias, c) estrutura fascicular nervosa transversal (*) encontrada entre fibras colágenas no grupo controle negativo.



6.5.3 Imunomarcacão com P75

A denteição culmina de uma série de eventos morfogenéticos que envolvem sinalização celular e liberação de moléculas quimioatrativas e fatores de crescimento. Um dos principais fatores de crescimento que atuam atraindo terminações nervosas é o fator de crescimento neural (NGF). A secreção deste fator no dente está relacionada com etapas de atração do nervo alveolar para o interior da papila dental, como já foi descrito na revisão da literatura, além de participar de vários outros estágios até o amadurecimento do elemento dental (Cowan *et al.*, 1997; Tomellini *et al.*, 2014).

A P75 é um receptor ancorado à membrana celular de células nervosas, que capta a sinalização vinda do NGF e culmina na migração das células nervosas ou prolongamento axônico até o local alvo (Cowan *et al.*, 1997). Assim, esta é uma molécula chave para avaliar a promoção da inervação espontânea no modelo utilizado neste estudo.

A imunodeteção de p75 ao longo dos tempos experimentais permaneceu constante entre os grupos não implantado, controle positivo e engenharia de polpa. É possível observar que no grupo não implantado, a imunodeteção das proteínas de escolha foi muito semelhante ao anticorpo anterior, com marcações pontuais semelhantes a terminações nervosas livres moderadamente marcadas (figuras 21 a) e regiões organizadas de feixes nervosos fortemente marcados que podem ser observadas nas figuras 21 b e c.

Aos 21 dias foi possível identificar organizações fasciculares no interior da polpa do grupo controle positivo, (Figura 22A) e marcações escassas no tecido ainda em organização do grupo teste (Figura 22E).

A partir de 28 dias observa-se no grupo de polpa neoformada por engenharia tecidual um maior preenchimento de tecido em substituição ao arcabouço e a presença de imunomarcações indicativas de fibras nervosas livres (Figura 22 F-H). Ainda para este grupo, aos 65 dias, foi possível identificar uma estrutura semelhante a fascículo nervoso (Figura 22H).

Enquanto isso, nas amostras do grupo controle negativo, ao longo dos tempos, foram encontradas marcações pontuais nas áreas onde havia a presença de algum tecido conjuntivo. Por fim, neste grupo, aos 65 dias, apesar da estrutura não estar bem organizada, pode-se sugerir a presença de um fascículo nervoso em um corte do tecido (Figura 22L).

Figura 21: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-P75 em polpas não implantadas. Em a) Observa-se poucas regiões com terminações nervosas livres na região subodontoblástica (aumento de 40x); b) Estruturas organizadas em fascículos fortemente marcadas em aumento de 40X; c) destaque para o fascículo nervoso em imersão (aumento de 100X).

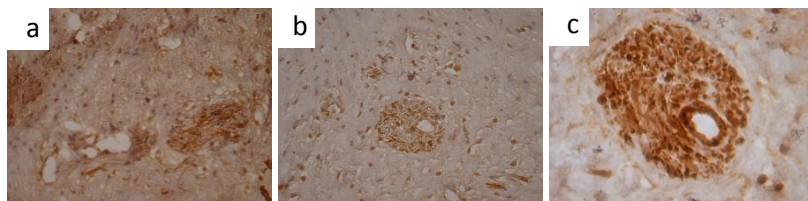
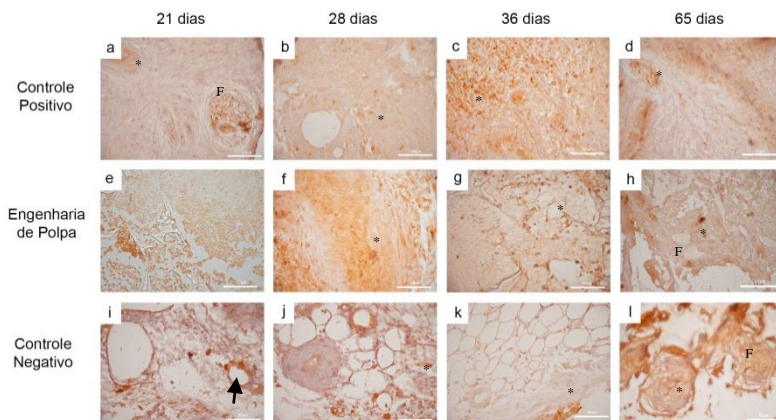


Figura 22: Fotomicrografias da imunolocalização da anti-p75.

Presença de Fascículo nervoso no grupo Controle Positivo (a) no grupo de Engenharia da Polpa (h) e no grupo Controle Negativo (l) e ainda marcações para terminações nervosas livres próximas a estruturas semelhantes a vasos sanguíneos (i) (seta).



6.5.4 Escores de imunomarcção

Tabela 2: Intensidade de imunomarcção para os diferentes anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica

Semimunomarcção (-); leve (+), moderada (++) e intensa (+++). (*) presença de terminações nervosas organizadas morfologicamente em fascículo nervoso).

Proteínas específicas	Dias					Grupos experimentais
	0	21	28	36	65	
β-Tubulina III	+++*	x	x	x	x	Sem implante
		+++	++	++*	++*	Controle Positivo
		-	+++	++	+++*	Engenharia de polpa
		-	-	+	++	Controle Negativo
NCAM	+++*					Sem implante
		+++	++	+	+++	Controle Positivo
		-	+++*	+++	+++*	Engenharia de polpa
		+	+	++	++*	Controle Negativo
P75	+++*					Sem implante
		+++	++	+++	++*	Controle Positivo
		+	++	+++	+++*	Engenharia de polpa
		+	+	++	++*	Controle Negativo

7 Discussão

Com os avanços no conhecimento da biologia das células-tronco e dos conceitos de engenharia tecidual, diversos grupos de pesquisa têm focado seus esforços em estudos que visam à formação de um dente completo (Eapet *et al.*, 2014; Kökten *et al.*, 2014). No entanto, manobras para evitar a perda do elemento dental, regenerando as estruturas lesadas ou perdidas por trauma ou injúria também devem ser investigadas. Os objetivos dos procedimentos endodônticos regenerativos são formar um tecido semelhante à polpa, que seja capaz de manter a interação do complexo dentino-pulpar, e regenerar estruturas comprometidas por algum fator ou evento aversivo (Nakashima and Huang, 2013). Em se tratando exclusivamente de injúrias em dentes imaturos, com rizogênese incompleta, o principal objetivo das terapias regenerativas é possibilitar a continuidade do crescimento até o completo desenvolvimento do elemento dental.

Para a regeneração de tecidos dentinários nos procedimentos de engenharia de tecido pulpar utilizando-se células-tronco, é fundamental que estas células tenham capacidade de diferenciação em odontoblastos (Nor, 2006; Martens *et al.*, 2013). Além disso, Nor e colaboradores (2006) afirmam que a melhor estrutura para servir de substituir um tecido perdido é o próprio tecido. Tem sido fortemente sugerido que a dentina, quando exposta a agentes agressores, libera moléculas bioativas, que serviriam de sinalizadores para determinar as funções de recrutamento de células imunocompetentes, diferenciação de odontoblastos e secreção de dentina reparadora. Além dos produtos secretados pela desmineralização da dentina, outra importante estrutura relacionada com o processo de defesa do elemento dental é a inervação.

Atualmente são aceitos 3 mecanismos de hipersensibilidade dental e todos eles estão relacionados com a interação entre as terminações nervosas e os odontoblastos (Byers and Narhi, 1999; Carda and Peydró, 2006; Chung *et al.*, 2013). Cada teoria proposta envolve a condução de sinais nociceptivos ao sistema nervoso central (Byers and Narhi, 1999). Nos últimos anos, estudos sobre as propriedades neuroanatômicas da polpa dental e mecanismos de nocicepção têm ganhado destaque na literatura (Byers and Taylor, 1993; Byers and Narhi, 1999; Byers *et al.*, 2003; Carda and Peydró, 2006; Couve *et al.*, 2013; 2014). Porém, poucos avanços foram feitos em relação à obtenção de um dente inervado, desenvolvido por engenharia tecidual.

Dessa forma este estudo vem contribuir para o conhecimento morfológico das estruturas neurais e de inervação pulpar, bem como o estudo do desenvolvimento neurogênico em polpas formadas pela técnica de engenharia tecidual. Neste trabalho, as estruturas detectadas pela técnica de imuno-histoquímica permite sugerir que o tecido neoformado é capaz de mimetizar o desenvolvimento de estruturas semelhantes a feixes nervosos. Outro aspecto relevante deste estudo, é que esta metodologia, embora já bem estabelecida em estudos anteriores, foi aplicada pela primeira vez em animais não imunossuprimidos, permitindo comprovar a possibilidade de implante xenógeno de células-tronco com efetiva interação com o hospedeiro e sem desencadear resposta imune aguda.

Antes do início dos experimentos propriamente ditos foram realizados estudos piloto para avaliar a possibilidade de se utilizar animais não imunossuprimidos, como uma adaptação da metodologia anteriormente empregada. Tendo em vista que nenhum parâmetro comportamental apresentou alteração, bem como não houve perdas no pós-operatório imediato e/ou tardio, na presença macroscópica de resposta inflamatória, a adaptação do protocolo foi considerada

satisfatória para a execução do estudo principal. De qualquer maneira, ao longo de todos os tempos experimentais da pesquisa, os animais foram constantemente monitorados e avaliados quanto ao surgimento de sinais macroscópicos de inflamação, como a presença de edema, vermelhidão ou pus no local do implante, perda de sutura, bem como aspectos comportamentais, considerando ganho/perda de peso, quantidade de ingesta e interação com os outros animais da gaiola. Essas observações estão de acordo com estudos prévios, também utilizando SHED, em implantes xenógenos (Pierdomenico *et al.*, 2005; Kerkis *et al.*, 2008).

O aspecto macroscópico das amostras ao se remover os implantes do dorso dos camundongos, mostrou a presença de vasos sanguíneos claramente atingindo a região da cavidade pulpar nos grupos controle positivo e engenharia tecidual e, esporadicamente, a cavidade pulpar das amostras contendo apenas arcabouço. Vale ressaltar que, para a adequada sobrevivência de quaisquer células, órgãos e/ou tecidos implantados, uma rápida e adequada vascularização é necessária para suprimento nutricional (Cordeiro *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2013). Levando isso em consideração, o menor suprimento vascular observado nas fatias do controle negativo pode explicar a baixa quantidade e qualidade de tecido conjuntivo encontrado histologicamente nestas amostras. Embora não tenham sido semeadas células neste grupo, poderia se esperar que células do hospedeiro migrassem até o local e se organizassem em um tecido no interior da cavidade pulpar, mesmo porque a dentina presente na fatia serviria como fonte de moléculas indutoras para tanto.

As análises microscópicas com coloração de HE revelaram a presença de uma camada de células justapostas em contato com a dentina nos grupos controle positivo e teste, sugerindo que as células-tronco se diferenciaram em células tipo odontoblastos, neste último. Embora este não tenha sido o objetivo primordial deste estudo, estes resultados podem ser comparados com os encontrados

por (Hahn and Liewehr, 2007; Cordeiro *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2010), que utilizaram o mesmo modelo de estudo com as fatias dentais, porém em camundongos imunossuprimidos, e os achados de (Syed-Picard *et al.*, 2014) que utilizou estruturas radiculares para a técnica de engenharia tecidual, também em animais não imunocompetentes, revelando também a presença de células semelhantes morfologicamente a odontoblastos. Este resultado é de grande valia uma vez que fica demonstrado, assim, que o uso de animais não imunossuprimidos não interfere nos achados já previamente descritos.

É importante ressaltar a presença de estruturas nervosas na polpa dental original e neoformada. As informações encontradas na literatura apresentam diversas definições contraditórias ou superficiais, a respeito da nomenclatura das estruturas nervosas na polpa dental (Luukko *et al.*, 2005; Carda and Peydró, 2006; Kqiku *et al.*, 2011). Ao perceber a carência de detalhamento quanto às estruturas nervosas que perfazem a inervação da polpa dental, percebeu-se a necessidade de uma adequada descrição morfológica dessas estruturas e, por isso, este estudo incorporou esta tarefa.

Como mencionado na revisão da literatura, se fez necessário o entendimento da histologia básica de nervos do sistema periférico com o intuito de comparar com as estruturas observadas nos grupos experimentais. Assim, foi possível caracterizar que a estrutura que chega ao germe dental na fase de odontogênese é um fascículo nervoso, proveniente do nervo alveolar inferior, no caso da mandíbula, e do nervo infraorbital, na maxila. Estruturas semelhantes a fascículos nervosos foram identificadas, tanto no grupo controle positivo, quanto nos grupos testes e controle negativo, embora neste último tenha se apresentado de forma menos organizada e mais esporádica. Para confirmar a presença de estruturas nervosas na polpa foram usados anticorpos específicos de membrana de células nervosas como anti- β tubulina III, anti-NCAM e anti-P75.

A β -tubulina III é um constituinte dos microtúbulos do citoesqueleto neuronal, e é requerida como molécula guia no crescimento axonal nos tecidos alvos em desenvolvimento. No entanto, alguns autores têm relatado a expressão de β -tubulina III em outros tipos celulares que não neurais, como células tumorais, células perivasculares, células musculares, fibroblastos e queratinócitos e células mesenquimais da polpa dental (Katsetos *et al.*, 2003; Shibasaki *et al.*, 2012; Stapor and Murfee, 2012; Foudah *et al.*, 2014). Para confirmar que as estruturas marcadas com β -tubulina III eram realmente estruturas nervosas, foi comparado a imunolocalização destas com os outros dois anticorpos, dessa maneira, foi possível confirmar a marcação de estruturas nervosas indicativas de terminações livres, com marcações pontuais e também organizadas em feixes. Embora o mesmo padrão tecidual de imunodeteção tenha sido verificado em grupos controle positivo e teste a partir de 28 dias de implantação, no grupo de engenharia pulpar de 21 dias, o tecido ainda não apresentava-se bem organizado e continha ainda bastante polímero e, por isso, não foi possível confirmar se as diferenças de tonalidades observadas são marcações ou artefato pela presença do arcabouço. A mesma dificuldade foi encontrada nos tempos de 21 e 28 dias para o controle negativo, no entanto, estruturas bem marcadas com um tom acastanhado foram observadas internalizadas entre os feixes de fibra colágena. Já no grupo de 36 dias do controle negativo, não ocorreu desenvolvimento tecidual que permitisse avaliar as imunolocalizações, ou estes foram danificados durante as técnicas pela alta quantidade de arcabouço residual.

As moléculas de adesão são formadas por diversos grupos de moléculas transmembrana que estão implicadas nas interações célula-célula ou célula-matriz extracelular baseadas na propriedade de adesão homofílica ou heterofílica (Shapiro *et al.*, 2007; Missaire and Hindges, 2015). A NCAM é uma molécula de adesão encontrada especificamente em células neurais e seus prolongamentos, estando

relacionada com a adesão homofílica. Seu papel é fundamental na fase de alongação e ramificação axonal nos tecidos alvo(Buttner *et al.*). A análise dos espécimes do grupo teste (polpa neoformada) demonstrou um aumento na imunolocalização dessa proteína, quando comparados com os do grupo controle positivo, o que pode ser devido ao fato de que as polpas originais, obtidas de terceiros molares hígidos, estavam em um estado de maturação mais avançado, sendo que as estruturas já estavam formadas, não havendo mais necessidade de grande migração e organização de células nervosas. Já no grupo de engenharia de polpa, o tecido está sendo formado, o que pode resultar no aumento proporcional na quantidade de marcação em relação ao tempo, a fim de organizar uma estrutura como um feixe nervoso. Cabe ressaltar que, aos 65 dias, nas amostras do grupo de polpa original, foi encontrado um aumento na expressão de NCAM, que pode ser explicado pela necessidade de reinervação, devido à secção dos feixes e terminações nervosas durante o corte do elemento dental para a obtenção das fatias. Neste caso, as células presentes no tecido conjuntivo podem ter aumentado a expressão dessa molécula de adesão para atrair prolongamentos axonais provenientes dos pares de nervos espinhais do hospedeiro de modo a promover a reinervação do tecido pulpar.

Outras moléculas que têm papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso periférico são as neurotrofinas, responsáveis por modular várias atividades celulares incluindo sobrevivência, crescimento deneuritos, ramificação e morfologia axonal(Cohen-Cory and Fraser, 1995).Esses efeitos das neurotrofinas são mediados por receptores que se encontram na membrana das células de origem do sistema nervoso. A P75 é o receptor de baixa afinidade para neurotrofinas,interagindo com todas elas, e queé encontrado em todas as classes de neurônios sensoriais. Baseado nisso, a expressão de p75 pode influenciar a inervação e a morfologia axonal, interagindo com o prolongamento do axônio, com as células de Schwann e migração das células de Schuwann(Bentley and Lee,

2000). É possível observar em cortes dos grupos de controle positivo e experimental de 65 dias, estruturas semelhantes a fascículos nervosos, circundadas por uma cápsula delgada de tecido fibroso delimitando os bordos da estrutura das adjacências. Observando cuidadosamente o interior destefascículo são encontradas estruturas circulares de coloração esbranquiçada indicando o espaço ocupado pela bainha de mielina, perdida durante o processamento histológico, ao lado de pontos imunomarcados, sugerindo presença de células de Schwann e seus prolongamentos, indicando que ali estão localizados os axônios do feixe nervoso. As características morfológicas descritas nas amostras deste estudo são condizentes com as encontradas no trabalho de (Bentley and Lee, 2000), apesar destes autores não terem investigado tecido dental.

Embora existam relatos na literatura de grupos de pesquisa que também conseguiram encontrar estruturas relacionadas à inervação em abordagens com engenharia tecidual, estes utilizaram meios indutivos para a diferenciação das células-tronco de polpa dental em células neuronais (Gronthos *et al.*, 2002; Abraham and Verfaillie, 2012; Sakai *et al.*, 2012). Deste modo, este estudo é inédito também quanto à não utilização premeditada de fatores de crescimento ou moléculas indutoras para induzir ou promover diferenciação e organização da porção nervosa do tecido pulpar. Esta indução pode ser atribuída, neste trabalho à ação das células-tronco como secretoras de fatores de crescimento ou estimulantes de diferenciação e/ou migração de prolongamentos de neurônios, ou mesmo de moléculas bioativas provenientes da dentina.

Os resultados apresentados nesta pesquisa apontam para a necessidade de maiores estudos que permitam compreender o processo indutor da formação das estruturas nervosas no tecido pulpar neoformado, a participação efetiva das células-tronco no processo, a quantificação e determinação da origem das terminações e fibras nervosas que penetram no tecido neoformado, dentre outros.

8 Conclusões

Com este estudo foi possível verificar que:

- 1) É possível desenvolver tecido conjuntivo semelhante à polpa dental utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar, implantado no subcutâneo do dorso de camundongos não imunossuprimidos;
- 2) É possível manter fatias dentais contendo tecido pulpar original viável no subcutâneo do dorso de camundongos não imunossuprimidos, o que pode ser de valia para diversos estudos sobre biologia e resposta do tecido pulpar;
- 3) Acontece um processo de neurogênese espontânea em fatias dentais/arcabouços semeados com células-tronco de polpa de dentes decíduos (SHED), implantados no subcutâneo do dorso de camundongos não imunossuprimidos;
- 4) As estruturas nervosas presentes no tecido pulpar desenvolvido por engenharia tecidual são morfológicamente semelhantes às encontradas na polpa original.

Referências

- ABRAHAM, R.; VERFAILLIE, C. M. Neural differentiation and support of neuroregeneration of non-neural adult stem cells. **Prog Brain Res**, v. 201, p. 17-34, 2012. ISSN 0079-6123.
- ALBUQUERQUE, M. T. et al. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. **J Dent Res**, v. 93, n. 12, p. 1222-31, Dec 2014. ISSN 0022-0345.
- ALLARD, B. et al. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts - Possible role in tooth pain transmission. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 29002-29010, Sep 2006. ISSN 0021-9258.
- ALVARADO, L. T. et al. TRPM8 Axonal Expression is Decreased in Painful Human Teeth with Irreversible Pulpitis and Cold Hyperalgesia. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 10, p. 1167-1171, 2007.
- ARANY, P. R. et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor-beta1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 238, p. 238ra69, May 28 2014. ISSN 1946-6234.
- ARMSTRONG, L. et al. Editorial: Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. **Stem Cells**, v. 30, n. 1, p. 2-9, Jan 2012. ISSN 1549-4918 (Electronic). 1066-5099 (Linking).
- ARTHUR, A. et al. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. **Stem Cells**, v. 27, n. 9, p. 2229-2237, 2009
- AVERY, J. K. et al. **Desenvolvimento e Histologia Bucal**. 3. Porto Alegre/São Paulo: Artmed/ Santos, 2005.
- BANCHS, F.; TROPE, M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?. **J Endod**, v.30, n.4, p. 196-200, April 2004.
- BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. J. **Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais**. 3. Rio de janeiro: 2012.
- BEI, M. Molecular genetics of tooth development. **Curr Opin Genet Dev**, v. 19, n. 5, p. 504-10, Oct 2009. ISSN 1879-0380 (Electronic) 0959-437X (Linking).

BENTLEY, C. A.; LEE, K. F. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. **J Neurosci**, v. 20, n. 20, p. 7706-15, Oct 15 2000. ISSN 0270-6474.

BERGGREEN, E. et al. Effect of denervation on healing after tooth replantation in the ferret. **Acta Odontol Scand**, v. 59, n. 6, p. 379-85, Dec 2001. ISSN 0001-6357 (Print)

BJORNDALE, L.; DEMANT, S.; DABELSTEEN, S. Depth and activity of carious lesions as indicators for the regenerative potential of dental pulp after intervention. In: (Ed.). **J Endod**. United States: 2014 American Association of Endodontists. Published by Elsevier Inc, v.40, 2014. p.S76-81. ISBN 1878-3554 (Electronic) 0099-2399 (Linking).

BUTTNER, B. et al. The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. n. 0006-291X (Print),

BYERS, M. R.; NARHI, M. V. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 10, n. 1, p. 4-39, 1999. ISSN 1045-4411 (Print) 1045-4411.

BYERS, M. R.; SUZUKI, H.; MAEDA, T. Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. **Microsc Res Tech**, v. 60, n. 5, p. 503-15, Apr 1 2003. ISSN 1059-910X (Print) 1059-910X (Linking).

BYERS, M. R.; WESTENBROEK, R. E. Odontoblasts in developing, mature and ageing rat teeth have multiple phenotypes that variably express all nine voltage-gated sodium channels. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 11, p. 1199-1220, 2011.

CARDA, C.; PEYDRÓ, A. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. **Tissue and Cell**, v. 38, n. 2, p. 141-150, 2006.

CHAGAS, J. L. et al. **Avaliação da inervação de dentes humanos com reabsorção radicular fisiológica ou patológica inflamatória**. PIBIC/CNPQ. Florianópolis: BIP/UFSC 2012.

CHIU, I. M.; VON HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 8, p. 1063-7, Aug 2012. ISSN 1097-6256.

CHUNG, G.; JUNG, S. J.; OH, S. B. Cellular and Molecular Mechanisms of Dental Nociception. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 11, p. 948-955, Nov 2013. ISSN 0022-0345.

COHEN-CORY, S.; FRASER, S. E. Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. **Nature**, v. 378, n. 6553, p. 192-6, Nov 9 1995. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

CORDEIRO, M. M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. n. 1878-3554 (Electronic), 2008

COURA, G. S. et al. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 5, p. 531-6, Oct 2008. ISSN 0022-3484.

COUVE, E.; OSORIO, R.; SCHMACHTENBERG, O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. **J Dent Res**, v. 92, n. 9, p. 765-72, Sep 2013. ISSN 0022-0345.

COUVE, E. et al. Reactionary dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 8, p. 788-793, 2014.

COWAN, W. M.; JESSELL, T. M.; ZIPURSKY, S. L. **Molecular and Cellular Approaches to Neural Development**. New York: 1997.

DEMARCO, F. F. et al. Dental Pulp Tissue engineering. **Braz. Dent. J.**, v. 22, n. 1, 2011.

DUARTE, B. D. P. **Avaliação do potencial ectomesenquimal das células da polpa dentária**. 2013. 65 (Mestrado). Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

EAP, S. et al. Nanofibers Implant Functionalized by Neural Growth Factor as a Strategy to Innervate a Bioengineered Tooth. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 3, p. 386-391, 2014.

FOUDAH, D. et al. Expression of neural markers by undifferentiated mesenchymal-like stem cells from different sources. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 987678, 2014. ISSN 2314-7156 (Electronic) 2314-7156 (Linking).

FRIED, K. et al. Target finding of pain nerve fibers: neural growth mechanisms in the tooth pulp. In: (Ed.). **Physiol Behav**. United States, v.92, 2007. p.40-5. ISBN 0031-9384 (Print). 0031-9384 (Linking).

FRIED, K. et al. Molecular signaling and pulpal nerve development. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 11, n. 3, p. 318-32, 2000. ISSN 1045-4411 (Print) 1045-4411 (Linking).

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J Dent Res**, v. 81, n. 8, p. 531-5, Aug 2002. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, Dec 5 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

HAHN, C. L.; LIEWEHR, F. R. Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 7, p. 773-781, 2007.

HUYSSSEUNE, A.; SIRE, J. Y.; WITTEN, P. E. **Evolutionary and developmental origins of the vertebrate dentition**: Journal of Anatomy: 465-476 p. 2009.

IOHARA, K. et al. A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. **Stem Cells Transl Med**, v. 2, n. 7, p. 521-33, Jul 2013. ISSN 2157-6564 (Print) 2157-6564.

JERNVALL, J.; THESLEFF, I. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. **Development**, v. 139, n. 19, p. 3487-97, Oct 2012. ISSN 0950-1991.

KATCHBURIAN, E.; V., A. **Histologia e Embriologia Oral**. 3. São Paulo: 2004.

KATSETOS, C. D.; HERMAN, M. M.; MORK, S. J. Class III beta-tubulin in human development and cancer. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 55, n. 2, p. 77-96, Jun 2003. ISSN 0886-1544 (Print) 0886-1544 (Linking).

KERKIS, I. et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J Transl Med**, v. 6, p. 35, 2008. ISSN 1479-5876.

KETTUNEN, P. et al. Coordination of trigeminal axon navigation and patterning with tooth organ formation: epithelial-mesenchymal interactions, and epithelial Wnt4 and Tgfbeta1 regulate semaphorin 3a expression in the dental mesenchyme. In: (Ed.). **Development**. England, v.132, 2005. p.323-34. ISBN 0950-1991 (Print). 0950-1991 (Linking).

KQIKU, L. et al. Histology and intramandibular course of the inferior alveolar nerve. **Clin Oral Investig**, v. 15, n. 6, p. 1013-6, Dec 2011. ISSN 1436-3771 (Electronic) 1432-6981 (Linking).

KÖKTEN, T. et al. Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

LOES, S. et al. Expression of class 3 semaphorins and neuropilin receptors in the developing mouse tooth. **Mechanisms of Development**, v. 101, n. 1-2, p. 191-194, Mar 2001. ISSN 0925-4773.

LUUKKO, K. Neuronal cells and neurotrophins in odontogenesis. **Eur J Oral Sci**, v. 106 Suppl 1, p. 80-93, Jan 1998. ISSN 0909-8836 (Print) 0909-8836.

LUUKKO, K.; KETTUNEN, P. Coordination of tooth morphogenesis and neuronal development through tissue interactions: lessons from mouse models. **Exp Cell Res**, v. 325, n. 2, p. 72-7, Jul 2014. ISSN 1090-2422.

LUUKKO, K.; KVINNSLAND, I. H.; KETTUNEN, P. Tissue interactions in the regulation of axon pathfinding during tooth morphogenesis. **Dev Dyn**, v. 234, n. 3, p. 482-8, Nov 2005. ISSN 1058-8388 (Print). 1058-8388 (Linking).

MAGLOIRE, H. et al. Odontoblast: a mechano-sensory cell. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 312b, n. 5, p. 416-24, Jul 15 2009. ISSN 1552-5007.

MALTMAN, D. J.; HARDY, S. A.; PRZYBORSKI, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 3, p. 347-356, 2011.

MARTENS, W. et al. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: An update. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 9, p. 1969-1983, 2013.

MARTENS, W. et al. Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. **Faseb j**, v. 28, n. 4, p. 1634-43, Apr 2014. ISSN 0892-6638.

MARTINI, F. H.; TIMMONS, M. J.; TALLITSCH, R. **Anatomia humana**. 6. 2009.

MAURIN, J. C. et al. Odontoblast expression of semaphorin 7A during innervation of human dentin. **Matrix Biology**, v. 24, n. 3, p. 232-238, May 2005. ISSN 0945-053X.

MAYO, V. et al. Neural crest-derived dental stem cells-Where we are and where we are going. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 9, p. 1043-1051, Sep 2014. ISSN 0300-5712.

MEIRA, R.; BARCELOS, R.; PRIMO, L. G. **Respostas do complexo dentino-pulpar aos traumatismos em dentes decíduos.** . Curitiba: 50-55 p. 2003

MESSER, L. B.; TILL, M. J. A landmark report on understanding the human dentition. **Journal of the American Dental Association**, v. 144, n. 4, p. 357-361, 2013.

MISSAIRE, M.; HINDGES, R. The role of cell adhesion molecules in visual circuit formation: from neurite outgrowth to maps and synaptic specificity. **Dev Neurobiol**, Feb 3 2015. ISSN 1932-846X (Electronic). 1932-8451 (Linking).

MITSIADIS, T. A. et al. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. **Adv Dent Res**, v. 23, n. 3, p. 275-9, Jul 2011. ISSN 0895-9374.

MITSIADIS, T. A.; LUUKKO, K. NEUROTROPHINS IN ODONTOGENESIS. **International Journal of Developmental Biology**, v. 39, n. 1, p. 195-202, Feb 1995. ISSN 0214-6282.

MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, May 13 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

MURPHY, W. L. et al. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2521-7, Dec 2000. ISSN 0142-9612 (Print).

NAGY, M. M. et al. Regenerative Potential of Immature Permanent Teeth with Necrotic Pulp after Different Regenerative Protocols. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 192-198, Feb 2014. ISSN 0099-2399.

NAKASHIMA, M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 3, p. 369-76, Jun 2005. ISSN 1359-6101 (Print).

NAKASHIMA, M.; HUANG, G. T. J. Pulp and Dentin Regeneration. In: (Ed.). **Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration**, 2013. p.461-484.

NANCI, A. **Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function**. Elsevier: St. Louis, Missouri, 2012.

NOR, J. E. Tooth regeneration in operative dentistry. **Oper Dent**, v. 31, n. 6, p. 633-42, Nov-Dec 2006. ISSN 0361-7734 (Print). 0361-7734 (Linking).

OBARA, N.; TAKEDA, M. Expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) during the first molar development in the mouse. **Anat Embryol (Berl)**, v. 187, n. 3, p. 209-19, Mar 1993. ISSN 0340-2061 (Print)

PAGELLA, P.; JIMENEZ-ROJO, L.; MITSIADIS, T. A. Roles of innervation in developing and regenerating orofacial tissues. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 12, p. 2241-51, Jun 2014. ISSN 1420-682x.

PARK, C. H. et al. Image-based, fiber guiding scaffolds: a platform for regenerating tissue interfaces. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 20, n. 7, p. 533-42, Jul 2014. ISSN 1937-3384.

PIERDOMENICO, L. et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836-42, Sep 27 2005. ISSN 0041-1337 (Print).

POLLI, V. **Avaliação da polpa dentária como nicho de células-tronco/progenitoras derivadas da crista neural**. 2011. (Dissertação de mestrado). Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RIBEIRO, C. A. O.; REIS FILHO, H. S.; GROTZER, S. R. Microscopia de luz. In: SANTOS (Ed.). **Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia**. São Paulo, 2012. p.422.

ROSA, V.; BOTERO, T. M.; NOR, J. E. Regenerative endodontics in light of the stem cell paradigm. **Int Dent J**, v. 61 Suppl 1, p. 23-8, Aug 2011. ISSN 0020-6539 (Print).

ROSSANT, J. The Impact of Developmental Biology on Pluripotent Stem Cell Research: Successes and Challenges. **Developmental Cell**, v. 21, n. 1, p. 20-23, 2011. ISSN 1534-5807.

SAKAI, K. et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 80-90, Jan 3 2012. ISSN 0021-9738.

SAKAI, V. T. et al. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. **Adv Dent Res**, v. 23, n. 3, p. 325-32, Jul 2011. ISSN 0895-9374.

SAKAI, V.T. et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **J Dent Res**, v. 89, n. 8, p. 791-6, Aug 2010. ISSN 0022-0345.

SHAPIRO, L.; LOVE, J.; COLMAN, D. R. Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. **Annu Rev Neurosci**, v. 30, p. 451-74, 2007. ISSN 0147-006X (Print).

SHIBAZAKI, M. et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of betaIII-tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells. **Int J Oncol**, v. 40, n. 3, p. 695-702, Mar 2012. ISSN 1791-2423 (Electronic). 1019-6439 (Linking).

SHRESTHA, A. et al. Sema3A chemorepellant regulates the timing and patterning of dental nerves during development of incisor tooth germ. **Cell Tissue Res**, v. 357, n. 1, p. 15-29, Jul 2014. ISSN 1432-0878 (Electronic). 0302-766X (Linking).

SMITH, A. J. Pulpal responses to caries and dental repair. **Caries Research**, v. 36, n. 4, p. 223-232, 2002.

SMITH, A. J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **J Dent Educ**, v. 67, n. 6, p. 678-89, Jun 2003. ISSN 0022-0337 (Print).

STAPOR, P. C.; MURFEE, W. L. Identification of class III beta-tubulin as a marker of angiogenic perivascular cells. In: (Ed.). **Microvasc Res**. United States: A 2011 Elsevier Inc, v.83, 2012. p.257-62. ISBN 1095-9319 (Electronic). 0026-2862 (Linking).

SYED-PICARD, F. N. et al. Scaffoldless tissue-engineered dental pulp cell constructs for endodontic therapy. **J Dent Res**, v. 93, n. 3, p. 250-5, Mar 2014. ISSN 0022-0345.

THESLEFF, I.; SHARPE, P. Signalling networks regulating dental development. **Mechanisms of Development**, v. 67, n. 2, p. 111-123, 1997. ISSN 0925-4773.

TOMELLINI, E. et al. Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: More than just a marker. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 13, p. 2467-2481, 2014.

VELEIRINHO, M. B. R. **Electrospun Fibrous mats for skin and abdominal wall repair**. 2012. (Doutor). Departamento de Quimica, Universidade de Aveiro, Portugal.

VERMA, A. K. et al. Role of dental expert in forensic odontology. **Natl J Maxillofac Surg.** , v. 5, n. 1, p. 2-5, 2014

WADA, N. et al. Semaphorin 3A Induces Mesenchymal-Stem-Like Properties in Human Periodontal Ligament Cells. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 18, p. 2225-2236, Sep 2014. ISSN 1547-3287.

YU, C.; ABBOTT, P. V. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. **Aust Dent J**, v. 52, n. 1 Suppl, p. S4-16, Mar 2007. ISSN 0045-0421 (Print).

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE Ciências morfológicas

TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO

Eu, Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, desenvolverei a pesquisa intitulada “Estudo da Neurogênese na Engenharia de Tecido Pulpar Humano”, com o objetivo de avaliar *in vivo* se células-tronco mesenquimais provenientes da polpa dental (nervo) de dentes decíduos humanos (dentes de leite) (já isoladas e disponíveis para pesquisa) são capazes de formar um novo tecido pulpar (nervo do dente), utilizando o Modelo de Fatia Dental/Arcabouço para Engenharia de Tecido Pulpar, que contenha terminações nervosas (fibras de nervos) no novo tecido formado, de maneira igual ao tecido original. Para isto serão utilizados dentes permanentes extraídos por motivos alheios a esta pesquisa, de modo a obter as fatias dentais. Os riscos e/ou desconforto são aqueles associados aos procedimentos da extração que não têm qualquer relação com a presente pesquisa, e nem haverá necessidade de procedimentos adicionais àqueles inerentes à extração do dente. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo pode entrar em contato pelo telefone (48) 3721 4904. Se você estiver de acordo em doar seu dente, garanto que será utilizado somente neste trabalho, e que não haverá ligação entre o dente doado e o paciente doador, ficando o dente à disposição do pesquisador.

Assinatura

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, fui esclarecido sobre a pesquisa “Estudo da Neurogênese na Engenharia de Tecido Pulpar Humano”, e concordo que meu dente, extraído por motivos alheios a esta pesquisa, seja utilizado na realização da mesma.

Assinatura

RG: _____ Dente: _____

Florianópolis, _____ de _____ de 20__.